

Untersuchungen zur Interaktion epiphyller Bakterien mit Blattoberflächen und Veränderungen in der Phyllosphäre während der Vegetationsperiode

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Ursula Krimm

aus

Lohr am Main

Bonn 2005

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Referent: Prof. Dr. Lukas Schreiber

2. Referent: Prof. Dr. Jobst H. Klemme

Tag der Promotion: 21.02.2005

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

INHALTSVERZEICHNIS

<u>1</u>	<u>EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1.1	Die Phyllosphäre	1
1.2	Rolle der Mikroorganismen	3
1.3	Fortschritte in der Forschung	4
1.4	Praktische Relevanz der Phyllosphärenforschung	5
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit	6
<u>2</u>	<u>DIE PHYLLOSPHÄRE ALS LEBENSRAUM</u>	<u>7</u>
2.1	Material und Methoden	7
2.1.1	Chemikalien	7
2.1.2	Transpirations- und Permeationsexperimente	7
2.1.2.1	Isolierung der Kutikularmembranen (CM)	10
2.1.2.2	Interaktion von verschiedenen Bakterienstämmen mit <i>Hedera</i> -CM	10
2.1.2.3	Interaktion von <i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> mit <i>Prunus</i> -CM	11
2.1.2.4	Interaktion von <i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> mit <i>Fragaria</i> -LD	13
2.1.2.5	Fruktosepermeabilität	14
2.1.3	Fruktoseverfügbarkeit auf der Blattoberfläche	15
2.1.3.1	Anzucht von <i>Eh299R46</i>	15
2.1.3.2	Detektion von Fruktose auf isolierten <i>Juglans</i> -CM durch <i>Eh299R46</i>	15
2.1.3.3	Detektion von Fruktose auf intakten Blättern durch <i>Eh299R46</i>	16
2.1.3.4	Epifluoreszenzmikroskopie	16
2.1.4	Statistische Bearbeitung der Daten	17
2.2	Ergebnisse	18
2.2.1	Interaktionen von Mikroorganismen mit der Kutikula	18
2.2.1.1	Interaktion von verschiedenen Bakterienstämmen mit <i>Hedera</i> -CM	18
2.2.1.2	Interaktion von <i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> mit <i>Prunus</i> -CM	20
2.2.1.3	Interaktion von <i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> mit <i>Fragaria</i> -LD	22
2.2.2	Nährstoffverfügbarkeit am Beispiel der Fruktose	23
2.2.2.1	Darstellung der Fruktoseverfügbarkeit mittels Bioreporter (<i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>)	23
2.2.2.2	Fruktosepermeabilität	28
2.3	Diskussion	30
2.3.1	Beeinflussung der kutikularen Permeabilität durch Mikroorganismen	30

2.3.2	Fructosepermeabilität	34
3	<u>UNTERSUCHUNGEN ZU <i>JUGLANS REGIA</i> L.</u>	41
3.1	Material und Methoden	41
3.1.1	Chemikalien	41
3.1.2	Pflanzenmaterial (<i>Juglans regia</i> L.)	41
3.1.3	Rasterelektronenmikroskopie	42
3.1.4	Evaluierung des Isolationsmediums	42
3.1.5	Isolation der Organismen von der Blattoberfläche	44
3.1.6	Bestimmung der Populationsdichte	44
3.1.7	ARDRA	45
3.1.8	Stammbaumkonstruktion	47
3.1.8.1	Stammbäume aus der Fragmente-Matrix	47
3.1.8.2	Stammbaum aus Sequenzen	48
3.1.9	Transpirationsmessung an <i>Juglans regia</i> Blattscheiben	48
3.1.10	Wachsanalytik (GC/FID und GC/MS)	49
3.2	Ergebnisse	51
3.2.1	Besiedlungsverlauf	51
3.2.2	Typisierung und Identifikation der bakteriellen Epiphyten mittels ARDRA	53
3.2.2.1	Auswahl der Stämme für ARDRA	53
3.2.2.2	Restriktionsanalyse	54
3.2.2.3	Stammbaumanalyse	56
3.2.2.4	Sequenzanalyse	58
3.2.2.5	Verteilung der Typen während der Vegetationsperiode	60
3.2.3	Rasterelektronenmikroskopie	63
3.2.4	Lichtmikroskopie	71
3.2.5	Wasserpermeabilität	72
3.2.6	Wachsanalyse	73
3.3	Diskussion	78
3.3.1	Artenspektrum	78
3.3.2	ARDRA	95
3.3.3	Populationsdichte und Besiedlungsverlauf	96
3.3.4	Zeitliche Entwicklung der mikrobiellen Diversität	97
3.3.5	Biofilme	99
3.3.6	Kutikula	102
3.3.7	Wasserpermeabilität und Wachsanalyse	103

<u>4</u>	<u>ABSCHLIESSENDE DISKUSSION UND AUSBLICK</u>	<u>105</u>
<u>5</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>107</u>
<u>6</u>	<u>VERZEICHNISSE</u>	<u>109</u>
6.1	Literatur	109
6.2	Quellen aus dem Internet	122
6.3	Abkürzungen	123
6.4	Abbildungen	124
6.5	Tabellen	126
<u>7</u>	<u>ANHANG</u>	<u>I</u>
7.1	ARDRA	I
7.1.1	Fragmentmuster und Fragmente-Matrix	I
7.1.2	Übersicht über die Probennahmen	III
7.1.3	Zusammenfassende Beschreibung der Typen	VI
7.1.4	Populationsdichten	XII

1 EINLEITUNG

Ebenso wie unterirdische Pflanzenteile von Mikroorganismen besiedelt sind und dieses Habitat Rhizosphäre genannt wird, so sind oberirdische Pflanzenteile normalerweise von einer Vielzahl von Bakterien, Hefen und Pilzen besiedelt. Dieses Habitat, welches durch die Kutikula (pflanzliche Grenzschicht), die Mikroorganismen und die abiotische Umwelt gebildet wird, nennt man Phyllosphäre. Die Phyllosphäre stellt ein extrem untergliedertes Habitat dar. Jedes Blatt für sich ist ein Lebensraum, ebenso die individuelle Pflanze, wie auch alle Pflanzen an diesem Standort. Die ökologische Bedeutung wird deutlich, wenn man die maximale Gesamtfläche betrachtet, die von der Phyllosphäre gebildet werden kann. Basierend auf weltweit erhobenen LANDSAT-Daten von 1981 – 1991 wurde die Gesamtblattfläche von terrestrischen Pflanzen – wenn die Blattfläche im jahreszeitlichen Verlauf am größten ist – auf eine Fläche von ca. $2 \cdot 10^8 \text{ km}^2$ geschätzt (Morris & Kinkel 2002). Wenn man nun bedenkt, dass Blätter eine Ober- und Unterseite besitzen, so ergibt sich mit $4 \cdot 10^8 \text{ km}^2$ eine Fläche, die 80 % der Erdoberfläche entspricht. Aquatische Pflanzen, die ebenfalls von Mikroorganismen besiedelt sind (Weidner et al. 2000), werden in dieser Abschätzung nicht berücksichtigt. Bakterielle Epiphyten, deren Populationsdichten in der Regel mit $10^4 - 10^8 \text{ CFU cm}^{-2}$ (Colony forming unit) angegeben werden führen bei einer Besiedlung von 10^4 CFU cm^{-2} und dem geschätzten Gewicht eines einzelnen Organismus von $3 \cdot 10^{-12} \text{ g}$ (siehe Kapitel 2.3.2) zu einer Biomasse von 120 000 T ($1.2 \cdot 10^{11} \text{ g}$), was 10^{22} Bakterien entspricht. Dies ist jedoch nur ein geringer Anteil der ca. 10^{30} prokaryotischen Zellen, welche die gesamte Erde besiedeln, angesichts der Oberfläche, die sie besiedeln, spielen sie sicherlich keine unbedeutende Rolle (Morris & Kinkel 2002). Die Diversität und Eigenschaften der Mikroorganismen, regulierenden Faktoren sowie ihre Interaktionen mit der biotischen und abiotischen Umwelt sind Gegenstand der Phyllosphärenforschung.

1.1 Die Phyllosphäre

Der Begriff Phyllosphäre wurde Mitte der 50er Jahre des letzten Jahrhunderts von F. Last und J. Ruinen geprägt (Fokkema 1991). Der Begriff leitet sich von den griechischen Wörtern φύλλον für Blatt und σφαίρα für (Erd-)Kugel ab und umfasst das Blatt bzw. alle oberirdische Pflanzenteile als Lebensraum.

Die Grenzschicht zwischen abiotischer Umwelt und Pflanzeninnerem, die Kutikula, bildet das Substrat auf dem die Mikroorganismen siedeln. Die Kutikula ist eine $< 1 \text{ }\mu\text{m}$ bis $15 \text{ }\mu\text{m}$ dicke Polymermembran, die den Epidermiszellwänden sowie Trichomen, Emergenzen und Drüsen aufgelagert ist (Riederer 1991). Die Kutikula wird durch eine Polymermatrix aus Kutin gebildet, in die Wachse ein- und aufgelagert sind. Kutin besteht hauptsächlich aus quervernetzten C_{16} - und

C₁₈-Hydroxyfettsäuren. Die Wachse bestehen aus einer Vielzahl von hydrophoben Verbindungen, wie langkettigen Fettsäuren, Alkoholen, Aldehyden, Estern, Ketonen, Terpenoiden und aromatischen Verbindungen (Jenks & Ashworth 1999). Man unterscheidet zwischen den interkutikularen, in die Kutinmatrix eingelagerten Wachsen und den aufgelagerten epikutikularen Wachsen, welche sich aus einem Wachsfilm und Wachskristallen zusammensetzen. Die intra- und epikutikularen Wachse können in der Zusammensetzung differieren (Jetter et al. 2000, Jetter & Schäffer 2001). Die kutikularen Wachse bilden für die Diffusion von Wasser und organischen Molekülen die eigentliche Transportbarriere (Riederer 1991).

Die vielfältige mikrobielle Flora auf Blättern besteht aus verschiedenen Arten von Bakterien, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen, weniger häufig findet man auch Protozoen und Nematoden. In klimatisch gemäßigten Regionen findet während der Vegetationsperiode für gewöhnlich eine Sukzession stat.: Im Frühjahr, wenn nur geringe Mengen an Nährstoffen (in Form von Exudaten) vorliegen, sind fast ausschließlich Bakterien zu finden. Im Sommer, wenn zusätzliche Nährstoffquellen wie Pollen und Blattlaus-Honigtau verfügbar sind, treten vermehrt Hefen auf. Gegen Ende der Vegetationsperiode beginnen viele der filamentösen Pilze auszukeimen, deren Sporen in den Monaten zuvor bereits auf der Kutikula deponiert wurden (Blakeman 1993). Die Mikroorganismen bzw. deren Verbreitungseinheiten gelangen hauptsächlich aus der Atmosphäre auf die Blattoberflächen. Der Eintrag findet zum einen passiv durch Absinken in die Phyllosphäre statt oder aktiv durch Regen oder Wind. Der Transport der Mikroorganismen kann von einem Blatt zum anderen über hunderte von Kilometern durch den Wind stattfinden. Durch Regen werden die Mikroorganismen aus der Atmosphäre ausgewaschen, zudem werden sie während und nach Regenfällen durch abtropfendes Wasser und kleinste Spritzwassertröpfchen von einem Blatt auf das andere übertragen (Pedley 1991).

Wie die Erforschung extremer Habitats gezeigt hat, sind Mikroorganismen in der Lage beinahe jedes nur erdenkliche Habitat zu besiedeln (Madigan et al. 2000). Was das Überleben in der Phyllosphäre aber so besonders schwierig gestaltet, sind die häufigen, wiederholten und schnellen Änderungen. Der Atmosphäre und Sonne ausgesetzt, sind die Blattflächen und somit ihre Bewohner Veränderungen in allen Aspekten des Mikroklimas ausgesetzt. Temperatur, relative Luftfeuchte, Windgeschwindigkeit, Strahlung und andere Faktoren können sich innerhalb kürzester Zeit drastisch ändern (Hirano & Upper 2000). Nährstoffe stehen in der Regel in geringen Mengen in Form von Exudaten und Eintrag aus der Umwelt zur Verfügung (Blakeman 1993).

1.2 Rolle der Mikroorganismen

Die Rolle der Mikroorganismen in der Phyllosphäre ist eines der Hauptforschungsthemen in der Phyllosphärenforschung (Fokkema 1991). Die einfache Fragestellung lautet, "Was tun die Bakterien da? Liegen sie nur so rum, oder passiert etwas?".

Ein Teil der Mikroorganismen liegt tatsächlich "nur so rum" und warten auf Bedingungen, die Aktivität und Wachstum ermöglichen (Kinkel 1997). Der andere Teil, der günstige Wachstumsbedingungen angetroffen hat, interagiert in vielfältiger Weise mit der Pflanze. Diese Interaktionen sind nicht immer von Vorteil für die Pflanze. Blätter können auf Temperaturen von -1 bis -5 °C abkühlen, ohne dass das Blatt gefriert, da gelöste Stoffe im Zytoplasma eine Gefrierpunktniedrigung bewirken können (Larcher 1994). *Pseudomonas syringae* und einige Arten aus anderen Familien, die das *ice*-Gen besitzen, können ein Gefrieren des Blattes in diesem Temperaturbereich bewirken. In der Landwirtschaft können bei frostsensitiven Pflanzen durch die Eisbildung im Pflanzengewebe hohe Schäden entstehen (Hirano & Upper 2000). Einige Interaktionen hingegen sind durchaus von Vorteil für die Pflanze. Die Inokulation von Weizen und Reis mit Stickstofffixierenden Arten (*Azotobacter* sp. und *Beijerinckia* sp.) führten zu stärkerem Pflanzenwachstum und Ertragssteigerung (Pati & Chandra 1993, Hirano & Upper 2000). Die Interaktionen von PPFM (Pink pigmentierte fakultative Methyloprophie) mit Pflanzen wurden intensiv untersucht (Kalyaeva et al. 2000, Romanovskaya et al. 2001, Trotsenko et al. 2001, Holland et al. 2002, Hornschuh et al. 2002). Arten der Gattung *Methylobacterium*, v. a. *Methylobacterium mesophilicum* können Methanol metabolisieren (Holland et al. 2002), das von Pflanzen durch die Stomata in die Umwelt abgegeben wird (Nemecek-Marshall et al. 1995). Die Bakterien produzieren Cytokinine, die das Pflanzenwachstum fördern; die Pflanzen wiederum emittieren Methanol, welches das Wachstum der PPFM stimuliert (Joshi & Holland 1999, Holland et al. 2002). Weitere Interaktionen sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Bakterien können die Benetzbarkeit der Blattoberfläche erhöhen und somit die Dauer der Wasserverfügbarkeit bei Austrocknung verlängern (Bunster et al. 1989, Knoll & Schreiber 1998, Knoll & Schreiber 2000). Der Wasserfilm, der durch bakterielle oberflächenaktive Substanzen (Biosurfactants) verursacht wird, kann die Bakterien weiter verbreiten (Abbildung 1A). Für *Pantoea agglomerans* konnte gezeigt werden, dass die Produktion eines Auxins mit verbesserter Fitness bei Trockenstress assoziiert war (Abbildung 1B). Aggregation zu Biofilmen und die Bildung einer Matrix schützt die Organismen vor schädlichen Umwelteinflüssen wie UV-Strahlung, freien Radikalen und Austrocknen. Innerhalb des Biofilms können sie kooperieren und so ihr Habitat effektiver beeinflussen (Lindow & Brandl 2003).

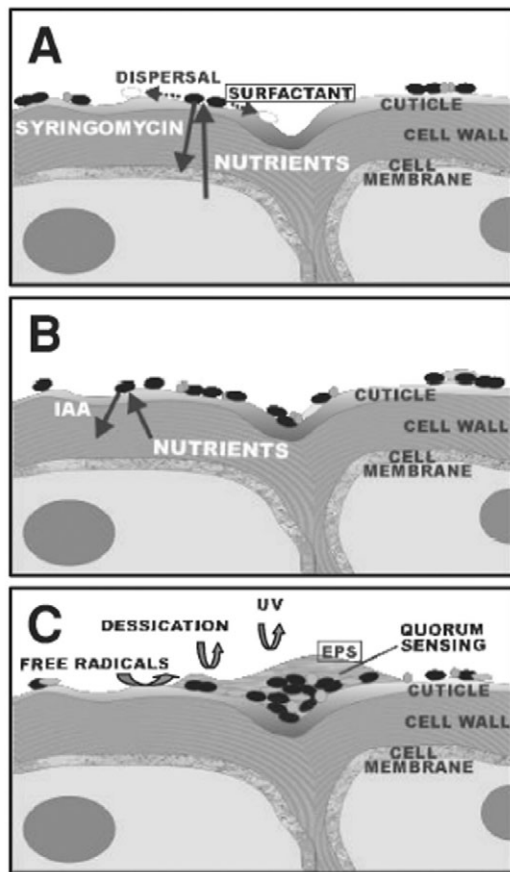


Abbildung 1 Schematische Darstellung verschiedener hypothetischer Bakterien – Habitat Modifikationen in der Phyllosphäre

(aus Lindow & Brandl 2003) A) Freisetzung von Nährstoffen durch die Pflanzenzelle und Ausbreitung der Bakterien ausgelöst durch die bakterielle Produktion von Sphingomycin. Sphingomycin kann sowohl als Phytotoxin als auch als oberflächenaktive Substanz wirken. B) Freisetzung von Sacchariden aus der Zellwand, verursacht durch bakterielle Sekretion von Auxin. C) Schutz vor Umweltstress durch die Produktion einer Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS).

1.3 Fortschritte in der Forschung

Bis vor wenigen Jahren war die Identifikation der Epiphyten auf kultivierbare Arten beschränkt und erforderte aufwändige Untersuchungen (z. B. Ercolani 1991). In einer wegweisenden Studie über Epiphyten auf verschiedenen *Citrus*-Arten, Mais, Bohne und Baumwolle zeigten Yang et al. (2001), dass Phyllosphärengemeinschaften viel komplexer sind als bis dahin vermutet, und viele der Arten noch nicht kultiviert waren. Sie entwickelten eine auf PCR (Polymerase Chain Reaction) basierende Methode, die bakterienhaltige Waschlösung von Blättern direkt als Ausgangsmaterial für die PCR verwendet.

Mit Hilfe von modernen molekularbiologischen Methoden konnten Bioreporter entwickelt werden, die es ermöglichen die Verfügbarkeit von überlebenswichtigen Faktoren (z. B. Nährstoffe, Wasser) aus der Sicht des Mikroorganismus zu untersuchen. Ein geeignetes Reportergen wird an einen Promoter angekoppelt, der durch Umweltfaktoren oder den Metabolismus aktiviert wird und als stabile genomische Insertion oder Plasmid in den Wirtsorganismus eingebracht. Als Reportergene werden am häufigsten grün fluoreszierendes Protein (GFP), Bakterien- oder Leuchtkeflerluziferase und β -Galaktosidase verwendet (Leveau & Lindow 2002). Loper und Lindow (1994) entwickelten einen Sensor für Eisen, mit dem sie die Verfügbarkeit von Fe(III) auf Blattoberflächen zeigen konnten. Eisenverfügbarkeit beeinflusst die Genexpression in Prokaryoten und ist besonders

wichtig für die Aktivität und den Metabolismus von Bakterien. Mit dem von Leveau und Lindow (2001) entwickelten fruktosesensitiven Bioreporter kann die Fruktoseverfügbarkeit z. B. auf Blattoberflächen nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ untersucht werden. Ein von Axtell und Beattie (2002) konstruierter Bioreporter zeigt die Wasserverfügbarkeit im Habitat an. Bioreporter werden zunehmend entwickelt und eingesetzt, da sie eine mikroskopische Erforschung der Phyllosphäre ermöglichen.

1.4 Praktische Relevanz der Phyllosphärenforschung

Ergebnisse aus der Phyllosphärenmikrobiologie finden hauptsächlich im biologischen Pflanzenbau und -schutz praktische Anwendung.

Die Ertragsteigernde Wirkung der Behandlung von Pflanzen mit PPFM und Methanoldüngung (siehe Kapitel 1.2) wurde patentiert (Polacco et al. 1993, Joshi & Holland 1999, Holland & Polacco 2000).

Im Pflanzenschutz wird hauptsächlich die antagonistische Wirkung von Organismen auf bekannte Pathogene genutzt. Zu diesem Themenbereich fanden vielfältige Studien zu Pathogenen auf Gemüse und Obst statt (Fiddaman et al. 2000, Yuen et al. 2001, Assis et al. 2002, Perello et al. 2002, Calvo et al. 2003, Daayf et al. 2003, Fiss et al. 2003, Abebanjo & Bankole 2004). In der Regel werden antagonistische Organismen auf die Pflanze oder das Erntegut aufgebracht, bevor das Pathogen sich ansiedeln kann. In Abbildung 2 ist schematisch am Beispiel von *Erwinia amylovora*, welches bei Rosaceen den gefürchteten Feuerbrand verursacht, der Ablauf und die Funktionsweise der Behandlung erläutert.

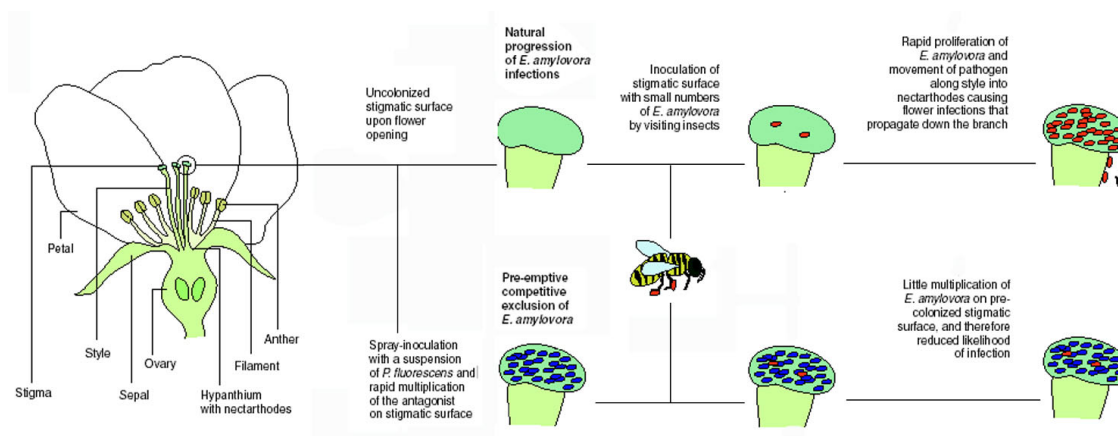


Abbildung 2 Einsatz von Bakterien im biologischen Pflanzenschutz

(Verändert nach Lindow und Leveau 2002) *Erwinia amylovora* verursacht Feuerbrand auf Pfirsich und Apfel. Sprühinokulation mit dem antagonistischen Stamm *Pseudomonas fluorescens* A506 (Blightban A506®), direkt beim Aufblühen, verhindert die Etablierung des Pathogens und folglich den Ausbruch der Krankheit.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Diese Arbeit gliedert sich in zwei Teilbereiche.

Die Phyllosphäre ist ein Habitat mit extremen Bedingungen. Wie können die Mikroorganismen auf der Kutikula überleben? Zwei der wichtigen, limitierenden Faktoren, Wasser- und Nährstoffverfügbarkeit, sollten im ersten Abschnitt untersucht werden.

Die hydrophobe Kutikula bildet den Lebensraum für die Mikroorganismen. Die Kutikula dient der Pflanze u. a. als Verdunstungsschutz. Von Schreiber & Knoll konnte bereits gezeigt werden, dass Bakterien die Benetzbarkeit der Kutikula herabsetzen können (Knoll & Schreiber 1998, Knoll & Schreiber 2000). In dieser Arbeit sollte nun der Frage nachgegangen werden, ob Bakterien in der Lage sind die Wasserverfügbarkeit zu verbessern, indem sie die Permeabilität der Kutikula für Wasser erhöhen. Dies sollte im Modell an isolierten Kutikularmembranen mit bekannten Phyllosphärenisolaten untersucht werden.

Nicht nur Wasser, sondern auch Nährstoffe sind ein limitierender Faktor in der Phyllosphäre. Als Modell-Nährstoff wurde Fruktose gewählt, da Fruktose natürlicherweise in der Pflanze vorkommt. Durch Einsatz eines genetisch veränderten Bakterienstammes (Bioreporter) konnte die Fruktoseverfügbarkeit auf der Blattoberfläche von *Phaseolus vulgaris*-Blättern gezeigt werden. Überraschenderweise ergab die Quantifizierung deutlich eine höhere Fruktoseverfügbarkeit als bisher angenommen (Leveau & Lindow 2001). Dies sollte mithilfe des Bioreporters im Kutikula-Modellsystem *in vitro* und auch am lebenden Blatt *in vivo* überprüft werden. Diese Ergebnisse sollten anschließend im Permeationsexperiment mit Fruktose als Modellnährstoff verifiziert werden.

Im zweiten Abschnitt sollte ein komplexes Bild über die Veränderungen in der Phyllosphäre von Walnuss (*Juglans regia* L.) während der Vegetationsperiode gewonnen werden. Dabei sollte der Einfluss der physikochemischen Eigenschaften der Kutikula auf die mikrobielle Population untersucht werden. Zusätzlich zur Ermittlung der Populationsdichte und bakteriellen Diversität zu verschiedenen Zeitpunkten, sollten deshalb auch die Wachsmenge, Wachszusammensetzung, Wasserpermeabilität und morphologische Beschaffenheit der Kutikula untersucht werden. Die mikroskopische Untersuchung der Blattoberflächen sollte zudem Aufschluss über die tatsächliche räumliche Verteilung der Organismen liefern.

2 DIE PHYLLOSPHÄRE ALS LEBENSRAUM

2.1 Material und Methoden

2.1.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben von Fluka (Schweiz), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) oder Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) in analysenreiner Form bezogen.

2.1.2 Transpirations- und Permationsexperimente

Der Transport von Wasser und gelösten Stoffen über die Kutikula ist ein passiver Prozess, der den Gesetzen der Diffusion folgt (Riederer 1991). Gemäß dem 1. Fickschen Diffusionsgesetz ist die Menge einer Substanz **n**, die in einer bestimmten Zeit **t** eine Membran passiert als Materiefluss **f** [mol s^{-1} , kg s^{-1} , DPM s^{-1}] definiert (Gleichung 1) (Adam et al. 1995). Den Materiefluss **f** über eine Membran bekannter Fläche **A** nennt man Fluss **F** [$\text{mol s}^{-1} \text{m}^2$, $\text{kg s}^{-1} \text{m}^2$, $\text{DPM s}^{-1} \text{m}^2$] (Gleichung 2).

$$f = \frac{n}{t} \quad \text{Gleichung 1}$$

$$F = \frac{f}{A} \quad \text{Gleichung 2}$$

F ist proportional zur treibenden Kraft ΔC [mol , kg , DPM], dem Konzentrationsgefälle der permeierenden Substanz über die Membran. Somit ergibt sich für die Proportionalitätskonstanten **P** [m s^{-1}], als Leitwert bezeichnet, folgende Gleichung:

$$F = P * \Delta C \text{ bzw. } P = \frac{F}{\Delta C} \quad \text{Gleichung 3}$$

Gleichung 3 ist nur gültig, wenn die treibende Kraft ΔC konstant ist, d.h. die permeierende Substanz im Donor-Kompartiment nicht wesentlich abnimmt.

Die Transpiration beschreibt die Diffusion von Wasser über die Kutikula von der physiologischen Innenseite der Kutikula bzw. der Blattunterseite aus. Im Versuch wird so der Wasserverlust der Pflanze durch die Transpiration über die Kutikula simuliert. Die kutikulare Transpiration kann sowohl gravimetrisch, als auch radioaktiv bestimmt werden. Der prinzipielle Versuchsaufbau (Abbildung 3) wurde von Schönherr & Lenzian 1981 unter der Verwendung von Plexiglas-Kammern entwickelt. Die Experimente dieser Arbeit wurden jedoch mit Edelstahl-Kammern durchgeführt (Geyer & Schönherr 1990). Die isolierte Kutikularmembran (Cuticular Membrane, CM) bzw. die Blattscheibe (Leaf Disk, LD) wird in eine Transpirationskammer eingesetzt, deren

Kontaktflächen zum Abdichten dünn mit Siliconfett bestrichen sind. Die physiologische Innenseite der CM bzw. die stomatöse Unterseite der LD zeigt zum Innern der Kammer. Für die gravimetrische Bestimmung wird die Kammer mit Wasser befüllt. Die Kammern werden kopfüber in einer Polyethylenbox mit aktiviertem Silicagel bei 25 °C und 0 % relativer Luftfeuchte (RF) inkubiert. Durch das Silicagel wird das Wasser, welches über die CM permeiert, absorbiert und somit der maximale Konzentrationsgradient aufrechterhalten. Der Wasserverlust über die Kutikula wird durch Wiegen der Kammern in regelmäßigen Abständen gemessen. Aus dem Gewichtsverlust innerhalb eines Zeitraumes lässt sich so der Fluss F und daraus nach Gleichung 3 der Leitwert P berechnen.

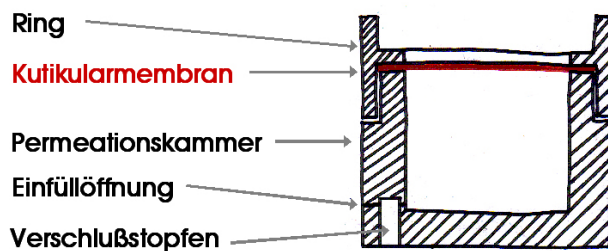


Abbildung 3 Querschnitt einer Transpirationskammer

Die Einfüllöffnung und der Verschlussstopfen sind optional.

Die radioaktive Bestimmung der Wasserpermeabilität erfolgt mit radioaktiv markiertem Wasser als Donorlösung. Der abgeänderte Versuchsaufbau ist in Abbildung 4 zu sehen (Schreiber 2001, Schreiber et al. 2001). Gemessen wird die Permeation von ^3H -markiertem Wasser über die CM bzw. LD. Die treibende Kraft ΔC entspricht der Konzentration an ^3H -markiertem Wasser im Donor. Um die treibende Kraft konstant zu halten, werden die Szintillationsgläschen regelmäßig ausgetauscht. Da die Temperatur Einfluss auf den Leitwert hat (Schreiber 2001), werden die Kammern bei konstanter Temperatur inkubiert. Dieser Versuchsaufbau ermöglicht zudem die Untersuchung des Leitwertes bei verschiedenen Luftfeuchten (Schreiber et al. 2001). Der Fluss von radioaktiv markiertem Wasser über die Kutikula lässt sich mit flüssigem Wasser als Receiver mit der Permeationskammer aus Abbildung 6 messen.

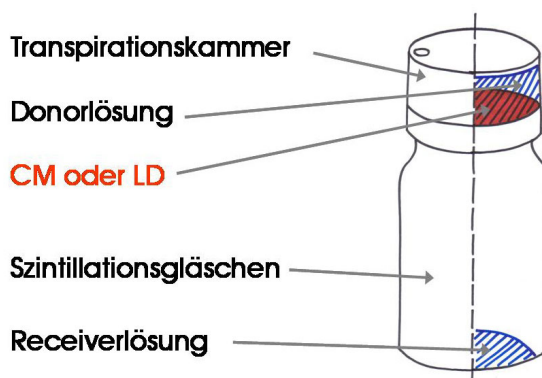


Abbildung 4 Versuchsanordnung für die Transpirationssmessung mittels radioaktiv markiertem Wasser

Die Transpirationskammer aus Abbildung 3 wird umgedreht auf einem Szintillationsgläschen platziert, das eine Receiverlösung enthält. Durch die Receiverlösung können verschiedene Luftfeuchten eingestellt werden.

Mit diesem Versuchsaufbau kann man die Beeinflussung der Permeabilität einer Membran durch eine chemische Substanz (z.B. Weichmacher) oder den Einfluss von Mikroorganismen untersuchen

(Abbildung 5). Im ersten Schritt wird der Ausgangsleitwert **P1** bestimmt. Im zweiten Schritt werden die Kammern von den Szintillationsgläsern entfernt, die untersuchende Substanz wird auf die CM oder LD appliziert. Im abschließenden Schritt wird der Endleitwert **P2** bestimmt. Für dessen Bestimmung ist es wichtig, dass die Donorkonzentration ausreichend hoch und bekannt ist. Aus **P1** und **P2** wird der Effekt **E1** der Behandlung berechnet (Gleichung 4).

$$E1 = \frac{P2}{P1} \quad \text{Gleichung 4}$$

Ist **E1** größer 1, so hat der Leitwert nach Behandlung zugenommen, d.h. die Substanz hat eine Erhöhung der Permeabilität bewirkt.

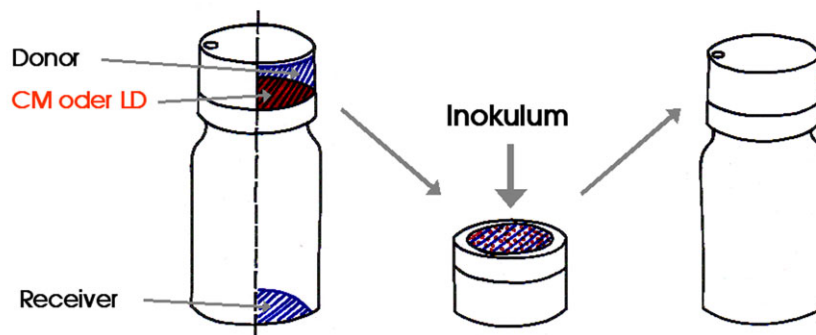


Abbildung 5 Versuchsanordnung: Beeinflussung der Permeabilität durch Applikation von Substanzen

Die Reversibilität des Effektes lässt sich überprüfen, indem man die CM oder LD abwäscht und den Leitwert **P3** bestimmt. Vergleicht man **P3** mit **P2**, so erhält man **E2** (Gleichung 5). Ist **E2** ≥ 1 , so ist der Prozess irreversibel oder hat sich gesteigert.

$$E2 = \frac{P3}{P2} \quad \text{Gleichung 5}$$

Vergleicht man **P3** mit **P1**, so erhält man **E3** (Gleichung 6). Ist **E3** = 1, so ist der Prozess reversibel und der Ausgangsleitwert **P1** wurde wieder erreicht. Ist **E3** = **E1**, so ist der Effekt irreversibel.

$$E3 = \frac{P3}{P1} \quad \text{Gleichung 6}$$

Mit diesem Versuchssystem lässt sich nicht nur der Fluss von Wasser über die Membran bestimmen, sondern mit einer Modifikation auch die Permeation anderer Substanzen (Abbildung 6). Die Permeation beschreibt die Diffusion einer Substanz über die Kutikula, je nach Fragestellung von innen oder außen. Die Permeation eines Stoffes kann bei optisch absorbierenden Stoffen photometrisch bestimmt werden (Schreiber et al. 1995), andere organische Verbindungen werden radioaktiv markiert verwendet (Kirsch et al. 1997, Niederl et al. 1998).

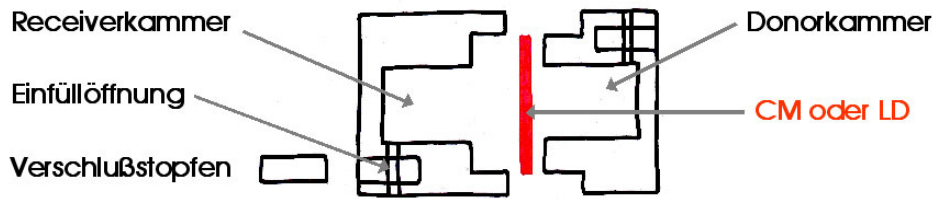


Abbildung 6 Permeationskammer

Der Versuchsablauf ist im Prinzip gleich den beiden oben genannten. Die zu untersuchende Substanz wird in die Donorkammer eingefüllt. Der Inhalt der Receiverkammer wird in regelmäßigen Abständen ausgetauscht, um auch hier das maximale Konzentrationsgefälle aufrecht zu erhalten. Auch mit diesem Versuchssystem kann man den Effekt von verschiedenen Substanzen auf die Permeabilität der Kutikula testen (Schreiber et al. 1995).

2.1.2.1 Isolierung der Kutikularmembranen (CM)

Aus augenscheinlich gesunden Blättern von *Hedera helix* L., *Prunus laurocerasus* L. und *Juglans regia* L. wurden mit einem Korkbohrer Blattscheiben von 2 cm Durchmesser ausgestanzt. Die stomatäre Blattunterseite wurde mit einem wasserfesten Stift gekennzeichnet. Die Blattscheiben wurden mit einer Enzymlösung (Cellulase 1 % (v/v) (Celluclast, Novozymes, Dänemark), Pektinase 1 % (v/v) (Trenolin Super DF, ERBSLÖH, Geißenheim), 10^{-3} M NaN_3 ad 1 l Citratpuffer (10^{-2} M Citronensäuremonohydrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), pH 3) vakuuminfiltiert und für mehrere Tage bei RT in der Lösung inkubiert. Die astomatären Kutikularmembranen der Epidermis der Blattoberseite wurden nach einigen Tagen aussortiert und für mehrere Tage in Boraxlösung (10^{-2} M Natriumtetraborat ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$), pH 9) inkubiert, um phenolische Verbindungen zu entfernen. Anschließend wurden die CM in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ gespült und unter einem leichten Luftstrom auf Teflonplättchen geglättet. Vor ihrer Verwendung wurden sie trocken bei RT für mehrere Monate gelagert (nach Schreiber et al. 1995).

2.1.2.2 Interaktion von verschiedenen Bakterienstämmen mit *Hedera*-CM

Versuchsanordnung wie in Abbildung 3 - Abbildung 5.

Enzymatisch isolierte *Hedera*-CM (2.1.2.1) wurden auf einem UV-Leuchttisch (Vilbert Lourmat, Frankreich) für 20 min sterilisiert, in sterilisierte Transpirationskammern (200°C , 1.5 h, Trockenschrank (Binder GmbH, Tuttlingen)) eingebaut und diese mit 800 μl einer radioaktiv markierten Donorlösung befüllt. Als Donorlösung diente Tritium-markiertes $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ mit einer Aktivität von $1.4 - 4.6 \cdot 10^6 \text{ DPM ml}^{-1}$ (spezifische Aktivität: 925 MBq g^{-1} , Hartmann Analytic GmbH, Braun-

schweig). Die Transpirationskammern wurden zum Abdichten mit Hochvakuumsilikonfett (Wacker Chemie GmbH, München) gefettet, auf Szintillationsgefäße gestellt und bei 25 °C im Dunklen in einem Kühlbrutschrank (Binder GmbH, Tuttlingen) inkubiert. Die Szintillationsgefäße wurden zuvor mit 1 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ befüllt und bei 25 °C äquilibriert. Nach einer Äquilibrationsphase von mind. 12 h wurden die Gefäße in regelmäßigen Abständen ausgetauscht, die Lösung mit 2 ml Szintillations-Cocktail Ultima Gold XR (Canberra Packard GmbH, Österreich) versetzt und im Flüssigszintillationszähler (TriCarb® 1600 CA, Canberra Packard GmbH, Österreich) gemessen. Für die Bestimmung des Ausgangsleitwertes P1 wurden der Fluss für mindestens 2 Tage gemessen.

Nach der Bestimmung des Ausgangsleitwertes wurden die CM mit 200 µl Übernachtskultur verschiedener Bakterien inokuliert (*Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*). Als Kontrolle wurden 200 µl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ verwendet. Die Bakterien wurden in M9-Medium (100 ml 10 x M9 (128 g Na_2HPO_4 , 30 g KH_2PO_4 , 5 g NaCl, 10 g NH_4Cl ad 1 l), 100 µl 1 M CaCl_2 , 1 ml 1 M MgSO_4 , mit 10 mM Glukose als Kohlenstoffquelle, nach Sambrook & Russel 2001) aus einer LB-Flüssigkultur angeimpft und bei 25°C und 180 RPM kultiviert (Brutschrank, Binder GmbH, Tuttlingen; Horizontalschüttler 3017, GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel). *Achromobacter* sp. wächst nicht auf Glukose und wurde für die Inokulation daher in 10%igem LB-Medium angezogen. Die optische Dichte der Kulturen wurde photometrisch bei 600 nm bestimmt (UVmini 1240, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg), und mit einer zuvor erstellten Wachstumskurve wurde die Zellzahl berechnet. Die Kammern wurden für 24 h bei 25 °C und 100 % RF inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Inokulum vorsichtig mit Zellstoff abgesaugt. Die CM wurden mit 200 µl PBS bzw. $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ für die H_2O -Kontrolle, gespült; die Spüllösung wurde ebenfalls vorsichtig mit Zellstoff abgesaugt.

Die Kammern wurden erneut bei 25 °C und 100 % RF inkubiert und der Leitwert P2 bestimmt.

Nach 3 Tagen wurden die CM mit 200 µl PBS bzw. 200 µl $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ für die H_2O -Kontrolle, gespült. Die Spüllösung wurde nach einer Einwirkzeit von 3 min vorsichtig mit Zellstoff abgesaugt. Die Transpiration wurde für weitere 4 Tage gemessen und der Endleitwert P3 bestimmt.

2.1.2.3 Interaktion von *Pseudomonas rhizosphaerae* mit *Prunus*-CM

Versuchsanordnung wie in Abbildung 3 - Abbildung 5.

Isolierte Kutikularmembranen von *Prunus laurocerasus* L. wurden in Transpirationskammern eingebaut. Die Kammern wurden zuvor mit 900 µl sterilem H_2O befüllt. Die CM wurden mit 99.9%igem Ethanol (Merck KGaA, Darmstadt) auf Dichtigkeit überprüft. Ethanol kann durch kleinste Löcher in der CM die Membran passieren und sich auf der physiologischen Innenseite der Kutikula ausbreiten; die Kutikula wird an dieser Stelle durchsichtig. Die Kammern wurden kopfüber

auf aktiviertes Silicagel (0 % RF) in PE-Boxen platziert und bei 25 °C über Nacht in einem Kühlbrutschrank (Binder GmbH, Tuttlingen) äquilibriert. Der Ausgangsleitwert P1 wurde durch tägliches Wiegen der Kammern auf einer Feinwaage (BP221 S, Sartorius AG, Göttingen) bestimmt.

Nach 7 Tagen wurden die Kammern aus den Boxen entnommen, umgedreht und die CM mit je 200 µl der folgenden Substanzen inokuliert: (I) steriles H₂O, (II) steriles M9-Medium mit 10⁻³ M NaN₃, (III) PBS (8 g NaCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.2 g KCl, 0.24 g KH₂PO₄ ad 1l) mit 10⁻³ M NaN₃, (IV) gewaschene Zellen von *Pseudomonas rhizosphaerae* (Fa4, AY131223) in PBS und (V – VII) steriler Kulturüberstand von *Pseudomonas rhizosphaerae* unterschiedlicher Zellkonzentrationen mit 10⁻³ M NaN₃. Natriumazid (NaN₃) verhindert das Wachstum von Mikroorganismen.

Die Bakterien wurden in M9-Medium (100 ml 10 x M9 (128 g Na₂HPO₄, 30 g KH₂PO₄, 5 g NaCl, 10 g NH₄Cl ad 1 l), 100 µl 1 M CaCl₂, 1 ml 1 M MgSO₄, mit 10 mM Glukose als Kohlenstoffquelle, Sambrook & Russel 2001) aus einer LB-Flüssigkultur angeimpft und bei 25 °C und 180 RPM kultiviert (Brutschrank, Binder GmbH, Tuttlingen; Horizontalschüttler 3017, GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel). Die optische Dichte der Kulturen wurde photometrisch bei 600 nm bestimmt (UVmini 1240, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg), und aus einer zuvor erstellten Wachstumskurve die Zellzahl berechnet. Für Inokulum IV wurden die Bakterien bei 8000 x g und 20 °C für 15 min zentrifugiert (Kühlzentrifuge 2019R, Napco, USA). Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet im ursprünglichen Volumen PBS resuspendiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Der Kulturüberstand (Inokula V – VII) wurde steril filtriert (Porengröße 0.2 µm, Schleicher & Schüll GmbH, Dassel) und mit 10⁻³ M NaN₃ versetzt.

Die Kammern wurden für 24 h bei 25 °C und 100 % RF inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Inokulum vorsichtig mit Zellstoff abgesaugt. Die CM wurden mit 200 µl PBS bzw. H₂O_{deion.} für die H₂O-Kontrolle, gespült. Die Spüllösung wurde ebenfalls vorsichtig mit Zellstoff abgesaugt. Die Kammern wurden erneut bei 25 °C und 0 % RF inkubiert und der Leitwert P2 bestimmt.

Nach der Bestimmung von P2 wurden die CM zweimal mit 200 µl PBS bzw. 200 µl H₂O_{deion.} für die H₂O-Kontrolle, gespült. Die Spüllösung wurde nach einer Einwirkzeit von 3 min vorsichtig mit Zellstoff abgesaugt. Die Transpiration wurde für weitere 4 Tage gemessen und der Endleitwert P3 bestimmt.

2.1.2.4 Interaktion von *Pseudomonas rhizosphaerae* mit *Fragaria*-LD

Versuchsanordnung wie in Abbildung 3 - Abbildung 5.

Die Messungen wurden mit Blättern von *Fragaria ananassa* cv. Elsanta aus dem Botanischen Garten Bonn vorgenommen. Aus zehn verschiedenen, augenscheinlich gesunden Blättern wurde jeweils eine Scheibe mit einem Korkbohrer (Durchmesser = 2 cm) ausgestanzt. Die Blattscheiben wurden, mit der Blattunterseite zum Donorkompartiment zeigend, in Transpirationskammern eingebaut, in die zuvor 900 µl Donorlösung eingefüllt worden war. Als Donorlösung diente Tritium-markierter Phosphorpuffer (PBS: 8 g NaCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.2 g KCl, 0.24 g KH₂PO₄ ad 1 l, Sambrook & Russel 2001) mit einer Aktivität von $4.8 \cdot 10^6$ DPM ml⁻¹ (spezifische Aktivität: 925 MBq g⁻¹, Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig). Die Transpirationskammern wurden zum Abdichten mit Hochvakuum silikonfett (Wacker Chemie GmbH, München) gefettet und auf Szintillationsgefäßen bei 25 °C und 100 % RF im Dunklen in einem Kühlbrutschrank (Binder GmbH, Tuttlingen) inkubiert. Die Szintillationsgefäße wurden zuvor mit 1 ml sterilem Wasser befüllt und bei 25 °C äquilibriert. Nach einer Äquilibrationsphase von mind. 12 h wurden die Gefäße in regelmäßigen Abständen ausgetauscht, die Lösung mit 2 ml Szintillations-Cocktail Ultima Gold XR (Canberra Packard GmbH, Österreich) versetzt und im Flüssigszintillationszähler (TriCarb® 1600 CA, Canberra Packard GmbH, Österreich) gemessen. Aus den linearen Flussdiagrammen wurde P1 berechnet.

Anschließend wurden die LD mit je 300 µl gewaschenen Zellen von *P. rhizosphaerae* in PBS und deren sterilem Kulturüberstand inokuliert und bei 25 °C und 100 % RF für 24 h inkubiert. Die Inokula wurden, wie in Kapitel 2.1.2.3 beschrieben, hergestellt. Nach der Inkubation wurde das Inokulum vorsichtig mit Zellstoff abgesaugt. Die LD wurden mit 300 µl PBS gespült; die Spüllösung wurde ebenfalls vorsichtig mit Zellstoff abgesaugt. Die Kammern wurden erneut bei 25 °C und 100 % RF auf Szintillationsgefäßen inkubiert und der Leitwert P2, wie zuvor beschrieben, bestimmt.

Da *Fragaria*-Blätter stark behaart sind und somit sehr empfindlich gegenüber Berührungen, wurden als Kontrolle unbehandelte LD herangezogen.

2.1.2.5 Fruktosepermeabilität

Versuchsanordnung wie in Abbildung 6.

Enzymatisch isolierte Kutikularmembranen von *Prunus laurocerasus* L. (2.1.2.1) wurden so in Permeationskammern eingebaut, dass die physiologische Innenseite der CM zum Donorkompartiment zeigte. Als Donor dienten 900 µl radioaktiv markiertes steriles H₂O mit einer Aktivität von $3.54 \cdot 10^6$ DPM ml⁻¹ (spezifische Aktivität: 925 MBq g⁻¹, Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig). Die Transpirationskammern wurden zuvor zum Abdichten mit Hochvakuum silikonfett (Wacker Chemie GmbH, München) gefettet. Die Kammern wurden in einem Kühlbrutschrank (Binder GmbH, Tuttlingen) bei 25 °C auf einem Rollband (Eigenkonstruktion) bei 60 RPM über Nacht äquilibriert. Am nächsten Tag wurde der Receiver entnommen und gegen 900 µl steriles H₂O_{deion.} mit 10⁻³ M NaN₃ ausgetauscht. Der Receiver wurde in regelmäßigen Abständen ausgetauscht, in Szintillationsgefäße überführt, mit 2 ml Szintillations-Cocktail Ultima Gold XR (Canberra Packard GmbH, Österreich) versetzt und im Flüssigszintillationszähler (TriCarb® 1600 CA, Canberra Packard GmbH, Österreich) gemessen. Die Kammern wurden während des gesamten Experimentes bei 25 °C auf dem Rollband inkubiert. Aus den linearen Flussdiagrammen wurde die Wasserpermeabilität P_{Wasser} berechnet.

Nach der 4. Messung wurde der Receiver nicht wieder aufgefüllt. Der Donor wurde entnommen, die Kammern mit 900 µl H₂O_{deion.} befüllt und kurz von Hand gerollt. Nach 30 min wurde das Spülwasser auf der Donorseite entfernt, beide Kammern mit 900 µl H₂O_{deion.} befüllt und für 4.5 h auf dem Rollband inkubiert. Das Spülen ist notwendig um Tritium zu entfernen, da die Gegenwart von Tritium in Proben mit ¹⁴C die Messwerte verfälschen kann.

Nach dem Spülen wurden die Kammern entleert und neue Donor- und Receiverlösungen eingefüllt. Als Receiverlösung diente 900 µl steriles H₂O_{deion.} mit 10⁻³ M NaN₃. Als Donorlösung wurden 900 µl einer ¹⁴C-Fruktose-Lösung mit 10⁻³ M NaN₃ verwendet. Die Messungen der Fruktosepermeabilität erfolgten sukzessive bei drei verschiedenen Fruktosekonzentrationen: (I) nur ¹⁴C-Fruktose mit einer Aktivität von $1.94 \cdot 10^6$ DPM ml⁻¹ (spezifische Aktivität: 925 MBq mmol⁻¹, Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig), $C_{\text{Fruktose I}} = 3.53 \cdot 10^{-6}$ M; (II) ¹⁴C-Fruktose mit einer Aktivität von $1.77 \cdot 10^6$ DPM ml⁻¹, $C_{\text{Fruktose II}} = 1.03 \cdot 10^{-4}$ M; (III) ¹⁴C-Fruktose mit einer Aktivität von $2.04 \cdot 10^6$ DPM ml⁻¹, $C_{\text{Fruktose III}} = 1.01 \cdot 10^{-3}$ M. Bei jeder Konzentration wurden mindestens drei Messungen durchgeführt und anschließend der Donor ohne Spülen ausgetauscht. Aus den linearen Flussdiagrammen wurden die Leitwerte $P_{\text{FruI}} - P_{\text{FruIII}}$ berechnet.

2.1.3 Fruktoseverfügbarkeit auf der Blattoberfläche

Die Fruktoseverfügbarkeit wurde mit einem Bioreporter sichtbar gemacht. *Eh299R* (pP_{fruB}-gfp[AAV]) (im Folgenden *Eh299R46* genannt) ist ein von Birne isoliertes Umweltisolat (*Erwinia herbicola*), das gentechnisch so verändert ist, dass es GFP exprimiert, wenn die Zelle Fruktose aufgenommen hat (Leveau & Lindow 2000).

2.1.3.1 Anzucht von *Eh299R46*

Die Zellen wurden auf LB-Agar mit Kanamycin (50 mg l⁻¹) und Rifampicin (40 mg l⁻¹) bei 30 °C vorkultiviert. Davon wurde in LB-Medium mit Kanamycin (50 mg l⁻¹) überimpft und bei 30 °C und 220 RPM über Nacht inkubiert. Von dieser Übernachtskultur wurden 20 - 50 µl in 5 ml Galaktose-Mineralsalz-Medium überimpft (40 ml enthalten: 33.6 ml H₂O, 80 µl 1M MgSO₄, 4 ml 10 x M9-Salze, 1.6 ml 10 % Galaktose, 0.8 ml 20 % Casaminoäuren (CAA), 40 µl Kanamycin (Stammlösung: 50 µg ml⁻¹)) und bei 30 °C und 220 RPM für 2 - 3 h auf dem Inkubationsschüttler (Brutschrank, Binder GmbH, Tuttlingen; Horizontalschüttler 3017, GFL Gesellschaft für Labor-technik mbH, Burgwedel) inkubiert.

2.1.3.2 Detektion von Fruktose auf isolierten *Juglans*-CM durch *Eh299R46*

Versuchsanordnung wie in Abbildung 4.

Transpirationskammern wurden wie in Kapitel 2.1.2.2 beschrieben mit isolierten *Juglans*-CM bestückt. Die CM wurden so eingebaut, dass die physiologische Innenseite der CM zum Kammerinneren gerichtet war. Die Dichtigkeit der CM wurde mit einem Tropfen 99.9%igem Ethanol überprüft. Nach der Evaporation des Ethanol wurden die CM mit je 200 µl Bakteriensuspension inokuliert. Die Kammern wurden bei 30 °C und 100 % RF in einer Polyethylen-Box über Nacht inkubiert (Brutschrank, Binder GmbH, Tuttlingen). Am nächsten Tag wurden Bakterien, die sich nicht an die Kutikula angeheftet hatten, durch Absaugen und Spülen der CM mit 200 µl PBS entfernt; PBS wurde ebenfalls mit Zellstoff abgesaugt. Die Kammern wurden mit je 800 µl Fruktose-Lösung unterschiedlicher Konzentration befüllt. Die Kammern wurden kopfüber auf ein Szintillationsgläschen mit 1 ml sterilem H₂O_{deion.} gestellt und bei 30 °C inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeiten wurde die Kutikula vorsichtig ausgebaut und mikroskopisch untersucht (siehe 2.1.3.4).

2.1.3.3 Detektion von Fruktose auf intakten Blättern durch *Eh299R46*

Blätter verschiedener Pflanzen wurden an mehreren Stellen mit 10 µl der Galaktose-Kultur von *Eh299R46* (siehe 2.1.3.1) auf der Ober- und Unterseite inokuliert. Die Blätter wurden in Polyethylenboxen bei 100 % RF und 30 °C inkubiert. Nach verschiedenen Inokulationszeiten wurde ein Tropfen abgenommen, das Segment aus dem Blatt herausgeschnitten und beides mikroskopisch untersucht (2.1.3.4), die restliche Probe wurde wieder inkubiert.

2.1.3.4 Epifluoreszenzmikroskopie

Blattstücke mit einer Größe von ca. 0.5 * 0.5 cm² bzw. CM wurden für 5 - 10 min in 0.1 % (w/v) Acridinorangelösung bzw. 0.01 % (w/v) 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) inkubiert. Anschließend wurden die Stücke vorsichtig mit H₂O_{steril} gespült, auf einem Objektträger fixiert und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Proben wurden mit einem Zeiss Axioplan (Carl Zeiss AG, Oberkochen) mikroskopiert. Die Fluoreszenzproben wurden mit einer Quecksilberdampfampe (HBO 50, Osram GmbH, München) angeregt. Es wurden folgende Filter verwendet:

Tabelle 1 Filter für die Epifluoreszenzmikroskopie

Filternummer	Anregungswellenlänge	Trennfilter	Abstrahlungswellenlänge
01 *	BP 365 / 12	FT 395	LP 397
09 *	BP 450 – 490	FT 510	LP 515
10 *	BP 450 – 490	FT 510	BP 515 - 565

* Carl Zeiss AG, Oberkochen

Acridinorange ist ein lipophiler Farbstoff, der an Nukleinsäuren bindet. Bei dsDNA zeigt sich eine grüne Fluoreszenz, bei ssDNA/RNA eine rote Fluoreszenz. Die Zellwand wird rot gefärbt, das Zellplasma je nach pH-Wert rot oder grün. DAPI ist ein DNA-Farbstoff der eine blaue Fluoreszenz zeigt.

2.1.4 Statistische Bearbeitung der Daten

Biologische Datensätze sind nicht immer normal verteilt. Um festzustellen ob die Daten normal oder log-normal verteilt sind, wurde die Häufigkeitsverteilung der Daten vor und nach log-Transformation ermittelt.

Die Bestimmung der Klassenbreite **b** erfolgte nach der Faustregel von Sturges (Köhler et al. 2002) (Gleichung 7) oder nach einer Modifikation von Gleichung 7 (Gleichung 8).

$$b = \frac{V}{1 + 3.32 * \lg n} \quad \text{Gleichung 7}$$

$$b = \frac{V}{(1 + 3.32 * \lg n) * 1.5} \quad \text{Gleichung 8}$$

b ... Klassenbreite

V ... Variationsbreite

n ... Stichprobenumfang

Die Berechnung der Häufigkeitsverteilung, des arithmetischen Mittels, des Medianes und der Schiefe wurde mit Microsoft Excel Formelvorlagen durchgeführt. Für die Berechnung der Gaußschen Verteilungskurve wurde die Formelvorlage von SigmaPlot 2001 (SPSS Inc., USA) verwendet.

Mittelwerte **MW** und Standardabweichungen **STD** wurden mit Microsoft Excel Formelvorlagen berechnet. Das Konfidenzintervall wurde aus dem t-Wert für das 95 % Signifikanzniveau ($\alpha = 0.005$), dem Mittelwert **MW** und der Standardabweichung **STD** berechnet (Gleichung 9).

$$\text{Obergrenze} = MW + tWert * \frac{STD}{\sqrt{n}} \quad \text{Gleichung 9}$$

$$\text{Untergrenze} = MW - tWert * \frac{STD}{\sqrt{n}}$$

Der Student t-Test, der aussagt, ob Datenreihen signifikant voneinander verschieden sind, wurde mit SigmaPlot (SPSS Inc., USA) durchgeführt.

2.2 Ergebnisse

2.2.1 Interaktionen von Mikroorganismen mit der Kutikula

2.2.1.1 Interaktion von verschiedenen Bakterienstämmen mit *Hedera*-CM

Die isolierten *Hedera*-CM wurden wie in 2.1.2.2 beschrieben in Transportkammern eingebaut und der Fluss von radioaktiv markiertem Wasser über die CM gemessen. Für alle CM konnten lineare Flüsse gemessen werden (siehe auch Abbildung 20). Aus dem Fluss wurde der Ausgangsleitwert P_1 berechnet. Da die Wasserpermeabilität der Kutikula einer log-normalen Verteilung folgt (Baur 1997), wurden die Leitwerte vor der statistischen Auswertung einer log-Transformation unterzogen. Der Leitwert betrug für die *Hedera*-CM aller Versuche im Mittel $2.25 \cdot 10^{-10} \text{ m s}^{-1}$, $+ 9.91 \cdot 10^{-11} \text{ m s}^{-1}$, $- 6.88 \cdot 10^{-11} \text{ m s}^{-1}$ ($n = 66$).

Die Resultate der Inokulation von *Hedera*-CM mit verschiedenen bakteriellen Umweltisolaten von *Hedera helix* L. Blättern aus dem Botanischen Garten Würzburg, sind in Abbildung 7 dargestellt.

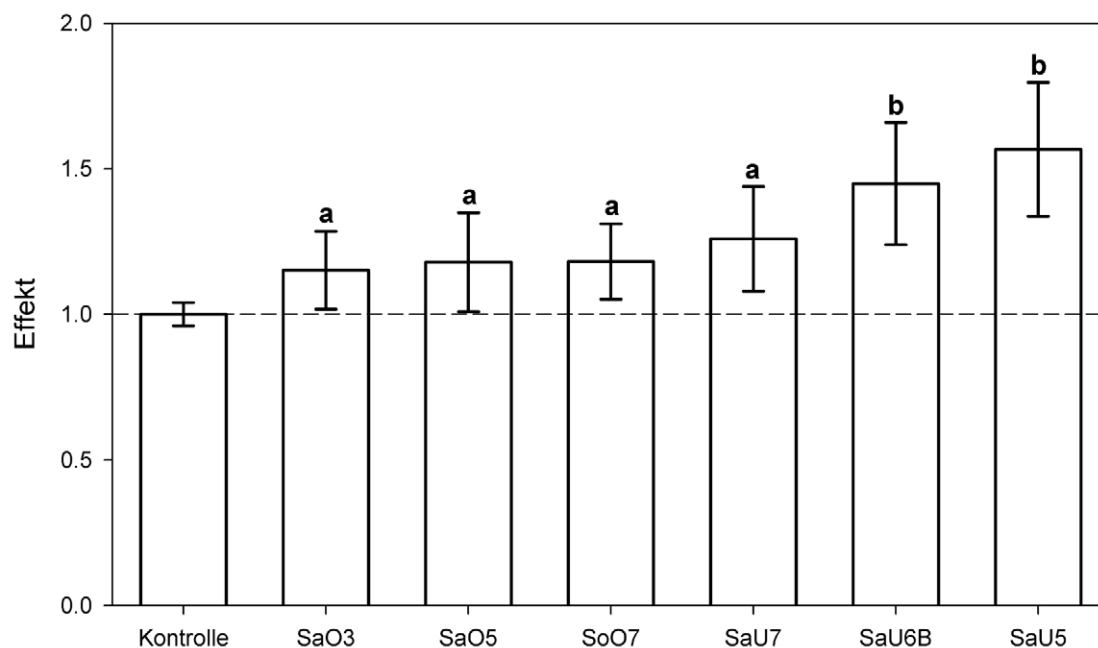


Abbildung 7 Effekte der Inokulation von *Hedera*-CM mit verschiedenen Bakterienstämmen

Dargestellt sind die Mittelwerte, die Fehlerbalken zeigen den 95 %-Vertrauensbereich. (a) unterscheidet sich signifikant von der Kontrolle, (b) unterscheidet sich signifikant von der Kontrolle und auch von SaO3, SaO5 und SoO7. Die Effekte wurden auf die Kontrolle normiert.

Da davon auszugehen ist, dass die mechanische Belastung, die während der Inokulation und des anschließenden Spülens auf die CM einwirkt, zu einer leichten Veränderung der Permeabilität führen kann, wurden zur Kontrolle CM mit 200 μl H_2O inokuliert und für 24 h inkubiert. Der

mittlere Effekt betrug 0.99 ± 0.04 ($n = 20$). Die Effekte der Inokulation mit Bakterien wurden auf diese Kontrolle normiert (wie in Abbildung 7 dargestellt).

Die Zellzahlen wurden nicht für alle Übernachtskulturen bestimmt. Die Inokulation der *Hedera*-CM mit einer Übernachtskultur von *Pseudomonas* sp. (SaO3, NCBI-Akzessionsnummer: AF511508) hatte einen Effekt von 1.13 ± 0.13 ($n = 8$); *Stenotrophomonas maltophilia* (SaO5, AF511515, $5.48 \cdot 10^9$ Zellen ml^{-1}) hatte einen Effekt von 1.18 ± 0.17 ($n = 8$); *Achromobacter xylosoxidans* (SoO7, AF511516, $1.85 \cdot 10^9$ Zellen ml^{-1}) hatte einen Effekt von 1.16 ± 0.13 ($n = 7$); *Pseudomonas* sp. (SaU7, AF511510, $4.56 \cdot 10^9$ Zellen ml^{-1}) hatte einen Effekt von 1.26 ± 0.18 ($n = 4$); *Pseudomonas* sp. (SaU6B, AF511509) hatte einen Effekt von 1.45 ± 0.21 ($n = 7$); *Pseudomonas graminis* (SaU5, AF511513, $9.04 \cdot 10^9$ Zellen ml^{-1}) hatte einen Effekt von 1.57 ± 0.23 ($n = 10$). Die Inokulation der CM mit Bakterien hatte bei allen Stämmen einen mittleren Effekt, der sich signifikant von der Kontrolle unterschied ($S > 95 \%$). Der mittlere Effekt der Behandlung mit SaU6B und SaU5 unterschied sich zudem signifikant von denen der anderen Stämmen (Abbildung 7).

Da es bisher noch keine Information darüber gibt, ob es sich bei diesem Effekt um einen reversiblen Prozess handelt, wurden in einem Teilversuch die CM nach der Bestimmung des Leitwertes P2 (nach Behandlung) mit je 200 μl PBS bzw. H_2O für die H_2O -Kontrolle, gespült (SaO3, SaU6B und Kontrolle). Anschließend wurde der Endleitwert P3 bestimmt.

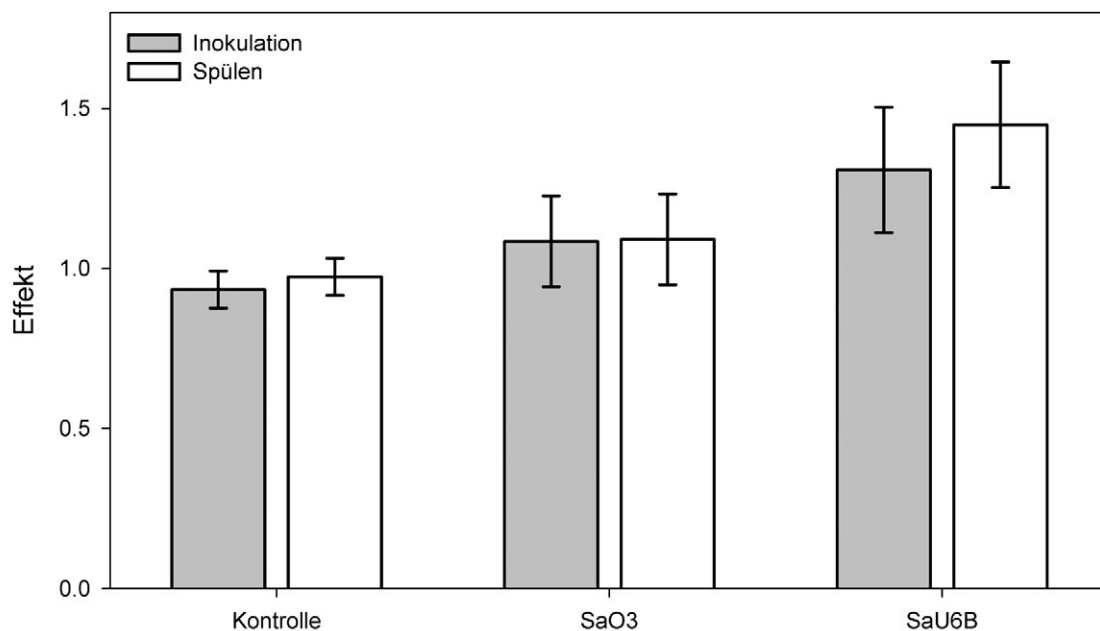


Abbildung 8 Vergleich der Effekte Inokulation (E1) und Spülen (E3) auf *Hedera*-CM
Dargestellt sind die Mittelwerte, die Fehlerbalken geben den 95 % Vertrauensbereich an.

Bei der Berechnung der mittleren Effekte (E1 und E3) wurden nur solche CM berücksichtigt, die über den gesamten Versuchszeitraum einen linearen Flussverlauf zeigten, daher ist die Anzahl der

Parallelen zum Teil geringer als im voran gegangenen Versuchsteil. Die Effekte wurden nicht auf die Kontrolle normiert, um die individuelle Änderung besser sichtbar zu machen.

Das Spülen der Kontrollen ($n = 8$) bewirkte eine Veränderung des Effektes von $E1 = 0.934 \pm 0.058$ nach $E3 = 0.974 \pm 0.058$; die Effekte unterschieden sich nicht signifikant (Abbildung 8). Das Spülen der mit SaO3 inokulierten CM ($n = 6$) bewirkte eine Veränderung des Effektes von $E1 = 1.085 \pm 0.079$ nach $E3 = 1.091 \pm 0.142$; die Effekte unterschieden sich nicht signifikant. Das Spülen der mit SaU6B inokulierten CM ($n = 7$) bewirkte eine Veränderung des Effektes von $E1 = 1.308 \pm 0.235$ nach $E3 = 1.449 \pm 0.196$; die Effekte unterschieden sich nicht signifikant.

Das Spülen der CM hatte entweder keinen Effekt (SaO3) oder es führte zu einer leichten Erhöhung der Effekte (Kontrolle, SaU6B), E3 unterschied sich jedoch in keinem Fall signifikant von E1.

2.2.1.2 Interaktion von *Pseudomonas rhizosphaerae* mit *Prunus*-CM

Die Kutikularmembranen wurden, wie unter 2.1.2.3 beschrieben, vorbereitet. Für alle CM konnten lineare Flüsse gemessen werden. Der Ausgangsleitwert betrug im Mittel $8.73 \cdot 10^{-10} \text{ m s}^{-1}$ ($+ 2.00 \cdot 10^{-10}$, $- 1.63 \cdot 10^{-10}$, $n = 66$).

Um auszuschließen, dass sowohl die Behandlung an sich, als auch das verwendete Medium und der Phosphorpuffer (PBS) einen Einfluss auf die Wasserpermeabilität der Kutikula haben, wurden diese als Kontrolle herangezogen.

Um den Effekt der Behandlung an sich auszuschließen, wurde die Kutikula mit Wasser behandelt und die Ergebnisse auf E_{Wasser} normiert ($E_{\text{Wasser}} = 1.12 \pm 0.12$, $n = 7$). Die Inokulation mit M9 Medium hatte einen Effekt von 1.03 ± 0.19 ($n = 6$) und unterschied sich nicht signifikant von E_{Wasser} . Die Inokulation mit PBS hatte einen Effekt von 0.94 ± 0.29 ($n = 4$) und unterschied sich nicht signifikant von E_{Wasser} und E_{Medium} . Die Inokulation mit gewaschenen Zellen in PBS (ca. $3 \cdot 10^{10}$ Zellen) hatte einen Effekt von 0.98 ± 0.17 ($n = 6$) und unterschied sich nicht signifikant von E_{Wasser} , E_{Medium} und E_{PBS} . Die Inokulation mit dem sterilen Kulturfiltrat von $3.88 \cdot 10^6$ Zellen ml^{-1} hatte einen Effekt von 1.16 ± 0.17 ($n = 18$) und unterschied sich nicht signifikant von E_{Wasser} , E_{Medium} , E_{PBS} und $E_{\text{Zellen in PBS}}$. Die Inokulation mit dem sterilen Kulturfiltrat von $1.66 \cdot 10^8$ Zellen ml^{-1} unterschied sich signifikant von E_{Wasser} , E_{PBS} und $E_{\text{Zellen in PBS}}$ und hatte einen Effekt von 1.19 ± 0.11 ($n = 11$). Die Inokulation mit dem sterilen Kulturfiltrat von $2.94 \cdot 10^{10}$ Zellen ml^{-1} hatte einen Effekt von 1.62 ± 0.32 ($n = 7$) und unterschied sich signifikant von allen anderen Behandlungen. Die Zellzahl des Kulturfiltrates ist positiv mit dem Effekt korreliert ($r^2 = 0.996$).

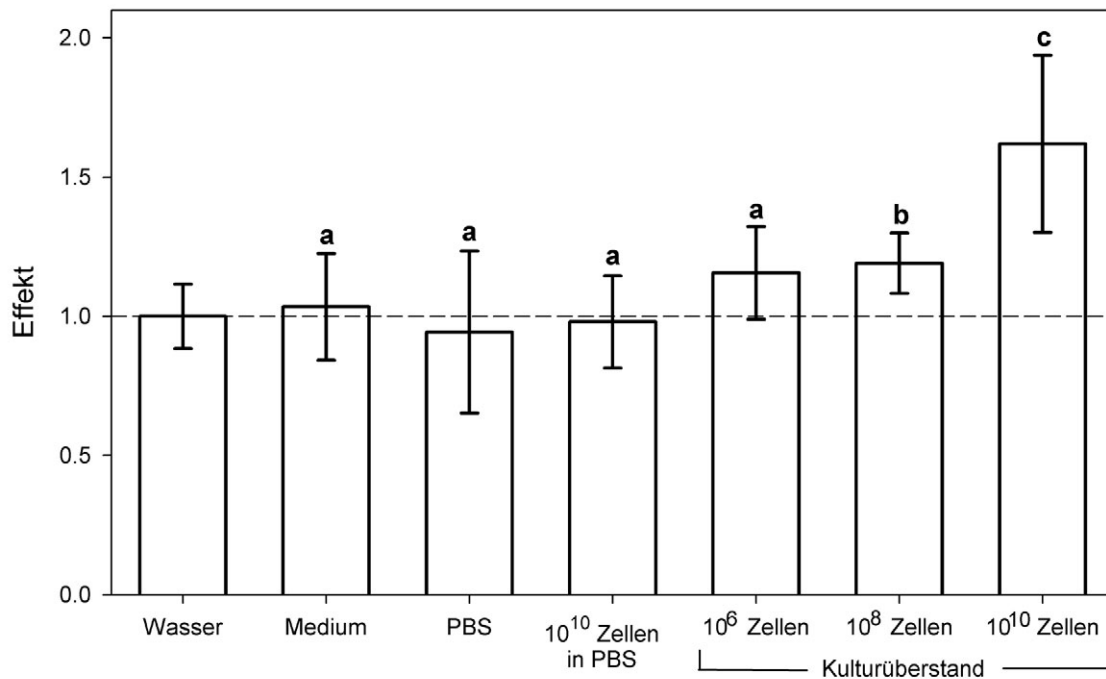


Abbildung 9 Effekte der Behandlung von *Prunus*-CM mit verschiedenen Inokula

(a) unterscheidet sich nicht signifikant von Wasser ($S \leq 95\%$); (b) unterscheidet sich signifikant von Wasser; (c) unterscheidet sich signifikant von allen ($S > 95\%$). Die Effekte wurden auf die Kontrolle normiert.

Wie bereits in Kapitel 2.1.2.2, wurde auch in diesem Versuch die Reversibilität der Effekte durch Spülen der CM getestet.

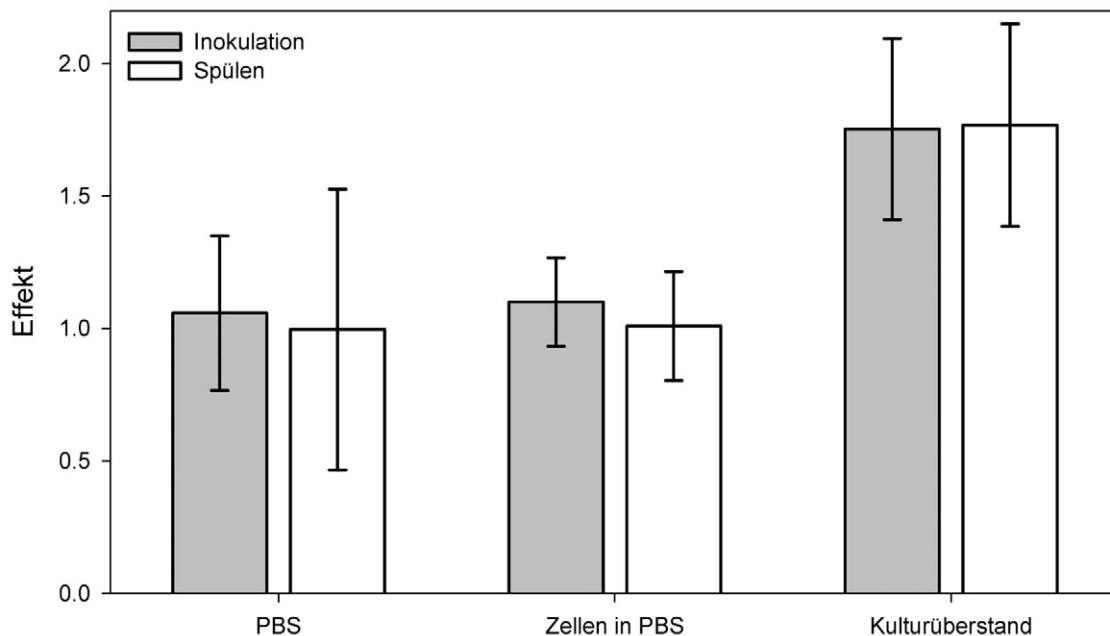


Abbildung 10 Vergleich der Effekte Inokulation (E1) und Spülen (E3) auf *Prunus*-CM

Dargestellt sind die Mittelwerte, die Fehlerbalken geben den 95 % Vertrauensbereich an.

Bei der Berechnung der mittleren Effekte (E1 und E3) wurden nur solche CM berücksichtigt, die bis zum Ende der Versuchsreihe intakt waren, daher ist die Anzahl der Parallelen zum Teil geringer als im voran gegangenen Versuchsteil. Die Effekte wurden nicht auf die Kontrolle normiert. Das Spülen der PBS-Kontrollen ($n = 4$) bewirkte eine Veränderung des Effektes von $E1 = 1.058 \pm 0.291$ nach $E3 = 0.996 \pm 0.530$; die Effekte unterschieden sich nicht signifikant (Abbildung 10). Das Spülen der mit gewaschenen Zellen in PBS inokulierten CM ($n = 6$) bewirkte eine Veränderung des Effektes von $E1 = 1.100 \pm 0.166$ nach $E3 = 1.009 \pm 0.205$; die Effekte unterschieden sich nicht signifikant. Das Spülen der, mit Kulturüberstand inokulierten CM ($n = 6$) bewirkte eine Veränderung des Effektes von $E1 = 1.753 \pm 0.342$ nach $E3 = 1.768 \pm 0.382$; die Effekte unterschieden sich nicht signifikant.

2.2.1.3 Interaktion von *Pseudomonas rhizosphaerae* mit *Fragaria*-LD

Die Blattscheiben wurden wie unter 2.1.2.4 beschrieben vorbereitet. Für alle LD konnten lineare Flüsse gemessen werden. Der Ausgangsleitwert der Erdbeerblattscheiben betrug im Mittel $1.46 \cdot 10^{-9} \text{ m s}^{-1}$ ($+2.19 \cdot 10^{-10}$, $-1.90 \cdot 10^{-10}$, $n = 26$).

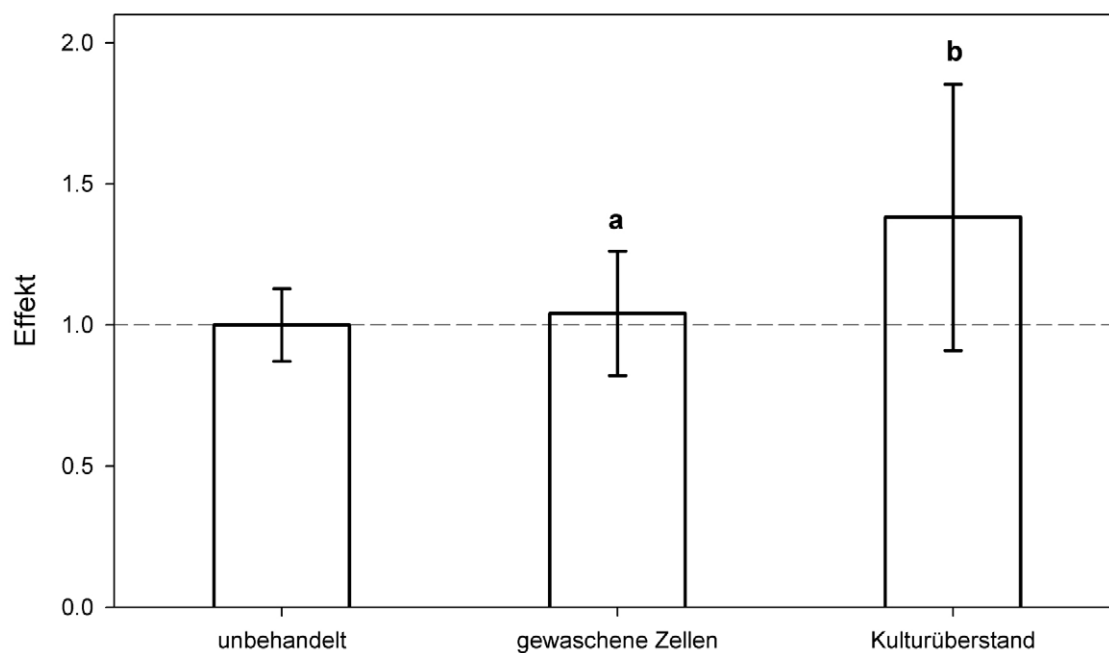


Abbildung 11 Effekte der Behandlung von *Fragaria*-Blattscheiben mit gewaschenen Zellen von *Pseudomonas rhizosphaerae* und deren Kulturüberstand

(a) unterscheidet sich nicht signifikant von $E_{\text{unbehandelt}}$; (b) unterscheidet sich signifikant von $E_{\text{unbehandelt}}$.

Die Inokulation mit gewaschenen Zellen von *P. rhizosphaerae* in PBS hatte keinen Effekt ($E_{\text{Zellen in PBS}} = 1.04 \pm 0.22$, $n = 9$). Die Effekte waren nicht signifikant verschieden von den unbehandelten Kontrollen.

Die Inokulation mit dem Kulturüberstand hatte einen mittleren Effekt von 1.38 ± 0.47 ($n = 7$), der sich signifikant von den unbehandelten Kontrollen unterschied ($S = 93.33 \%$) (Abbildung 11). Die Zelldichte der ursprünglichen Kultur betrug $2.28 \cdot 10^8$ Zellen ml^{-1} .

2.2.2 Nährstoffverfügbarkeit am Beispiel der Fruktose

2.2.2.1 Darstellung der Fruktoseverfügbarkeit mittels Bioreporter (*in vitro* und *in vivo*)

Fruktoseverfügbarkeit *in vitro* (2.1.3.2).

Die Permeation von Fruktose über isolierte CM von *Juglans regia* L. wurde über einen Zeitraum von 24 h gemessen. Um auch die Bakterien sichtbar zu machen, die kein GFP exprimierten, wurden die CM ausgebaut und mit Acridinorange bzw. DAPI gefärbt (2.1.3.4). Zunächst wurde getestet welche Färbung sich eignet. Beide Farbstoffe eignen sich gut, aber Acridinorange hat den Vorteil, dass man ohne Filterwechsel am Mikroskop induzierte und nicht induzierte Bakterien voneinander unterscheiden kann (Abbildung 13). Bei DAPI ist kein Unterschied zu erkennen (Abbildung 12 a). Acridinorange färbt die Mikroorganismen rot, die GFP exprimierenden Bakterien (GFPB) erscheinen jedoch gelblich bis grün und sind gut zu unterscheiden.

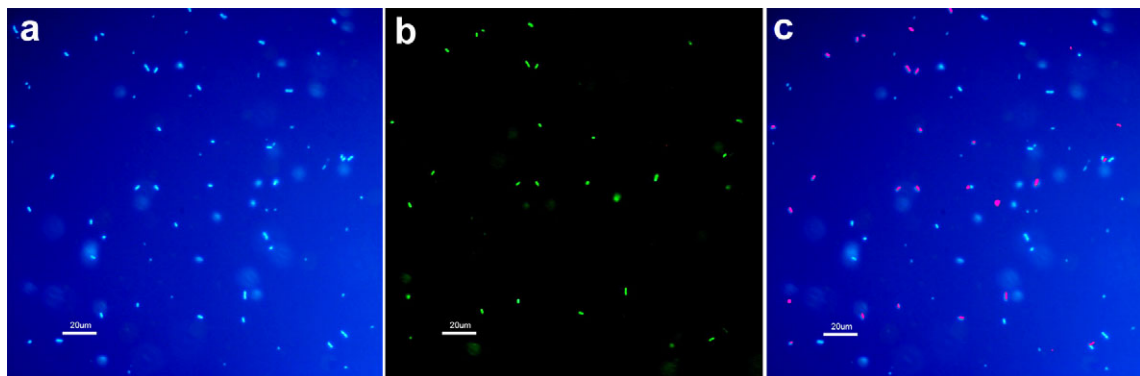


Abbildung 12 Vergleich DAPI und GFP

Teilinduzierte Probe mit DAPI gefärbt, Aufnahme mit verschiedenen Filtern. (a) DAPI-Färbung, Filtersatz 01, (b) nur GFP exprimierende Organismen, Filtersatz 09, (c) Bild a und b übereinander gelegt, die GFPB wurden rosa eingefärbt um sie besser vom Blau abzuheben.

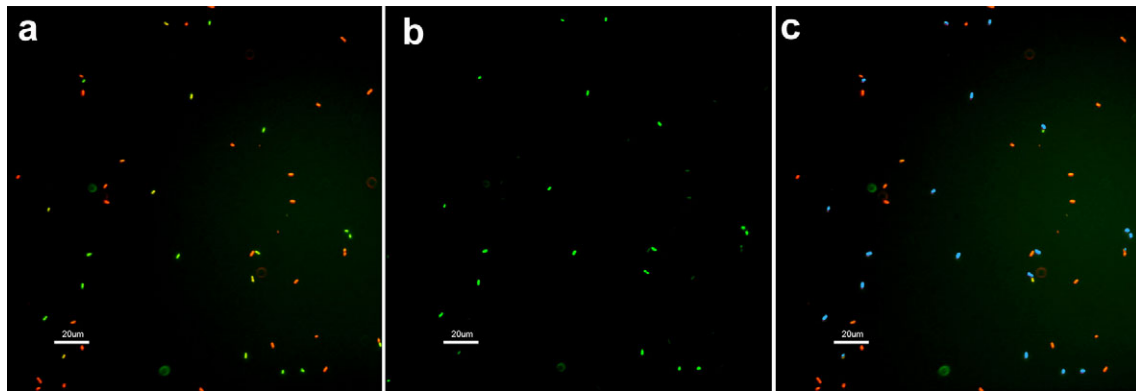


Abbildung 13 Vergleich Acridinorange mit GFP

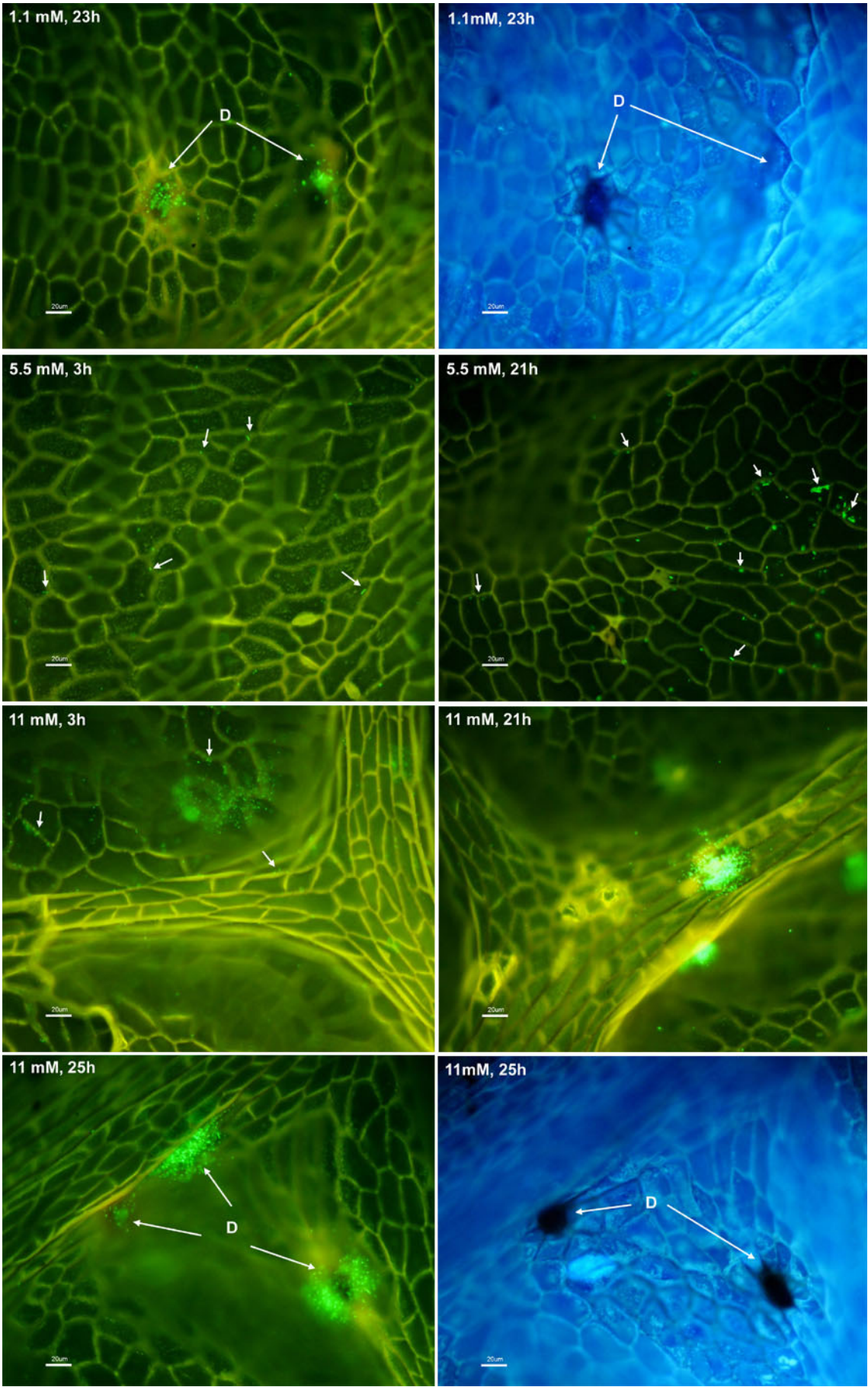
Teilinduzierte Probe mit Acridinorange gefärbt, Aufnahme mit verschiedenen Filtern. (a) Acridinorange-Färbung, Filtersatz 09, (b) nur GFP exprimierende Organismen, Filtersatz 10, (c) Bild a und b übereinander gelegt, die GFP wurden blau eingefärbt.

Die Permeation von Fruktose wurde mit dem Bioreporter *Eh299R46* am Beispiel von *Juglans regia* L. sichtbar gemacht. Die CM wurden, wie in Kapitel 2.1.3.2 beschrieben, in Transpirationskammern eingebaut, mit Bakterien inokuliert und auf der physiologischen Innenseite der CM wurden Fruktoselösungen unterschiedlicher Konzentration angeboten. Bei zwei, nacheinander durchgeführten Versuchsreihen gab es verschiedene Ergebnisse. Im ersten Experiment (Abbildung 14) wurden die Organismen mit DAPI gefärbt. Bei der niedrigsten Konzentration von 1.1 mM Fruktose konnten nach 3 h keine GFP exprimierenden Mikroorganismen detektiert werden. Nach 23 h finden sich GFPB hauptsächlich an Drüsenansatzstellen in der Nähe der Blattadern (Abbildung 14, obere Reihe), auf dem rechten Bild ist erkennbar, dass die Kutikula dicht mit Mikroorganismen besiedelt ist (hellblaue Punkte). Diese Drüsenansatzstellen sind keine Löcher in der Kutikula, aber wahrscheinlich Bereiche höherer Permeabilität. Bei einer Konzentration von 5.5 mM Fruktose zeigen sich bereits nach 3 h vereinzelt GFPB entlang der Kutikularleisten, die durch die antiklinen Zellwände der Epidermiszellen entstehen und so deren Muster abbilden. Nach 21 h hat deren Anteil leicht zugenommen (Abbildung 14, 2. Reihe). Bei der höchsten Konzentration von 11 mM zeigen sich bereits nach 3 h deutlich mehr GFPB entlang der Kutikularleisten. Nach 21 bzw. 25 h sind GFPB hauptsächlich im Bereich von Drüsenansatzstellen zu beobachten (Abbildung 14, Reihe 3 und 4).

Abbildung folgende Seite:

Abbildung 14 Fruktosepermeation über *Juglans*-CM (I)

Die Konzentration der Fruktoselösung und die Inkubationsdauer sind in jedem Bild angegeben. Größenmarker = 20 µm. Die Organismen wurden mit DAPI gefärbt; Filtersatz 10, bei den blauen Photographien wurde Filtersatz 01 verwendet. Die kleinen Pfeile verweisen auf Bakterien entlang der Epidermiszellwände, die großen Pfeile verweisen auf Bakterien in der Nähe von Drüsenansatzstellen (D).



In einem zweiten Versuchsdurchlauf wurden die Mikroorganismen mit Acridinorange angefärbt. Die Mikroorganismen siedeln bevorzugt entlang der Kutikularleisten. Bei einer Konzentration von 1.1 mM Fruktose sind nach 3.5 h vereinzelt GFPB entlang der Kutikularleisten erkennbar (Abbildung 15, links oben). Nach 19.5 h haben sich die Organismen vermehrt und besiedeln auch Bereiche außerhalb der Kutikularleisten (Rot-Färbung), GFPB sind im Bereich der Kutikularleisten (Abbildung 15, rechts oben und links unten) und Drüsenansatzstellen (Abbildung 15, links unten) in großer Zahl erkennbar. Bei einer Konzentration von 11 mM Fruktose sind nach 19.5 h kaum noch Bakterien zu erkennen, die kein GFP exprimieren (Abbildung 15, rechts unten, Pfeile).

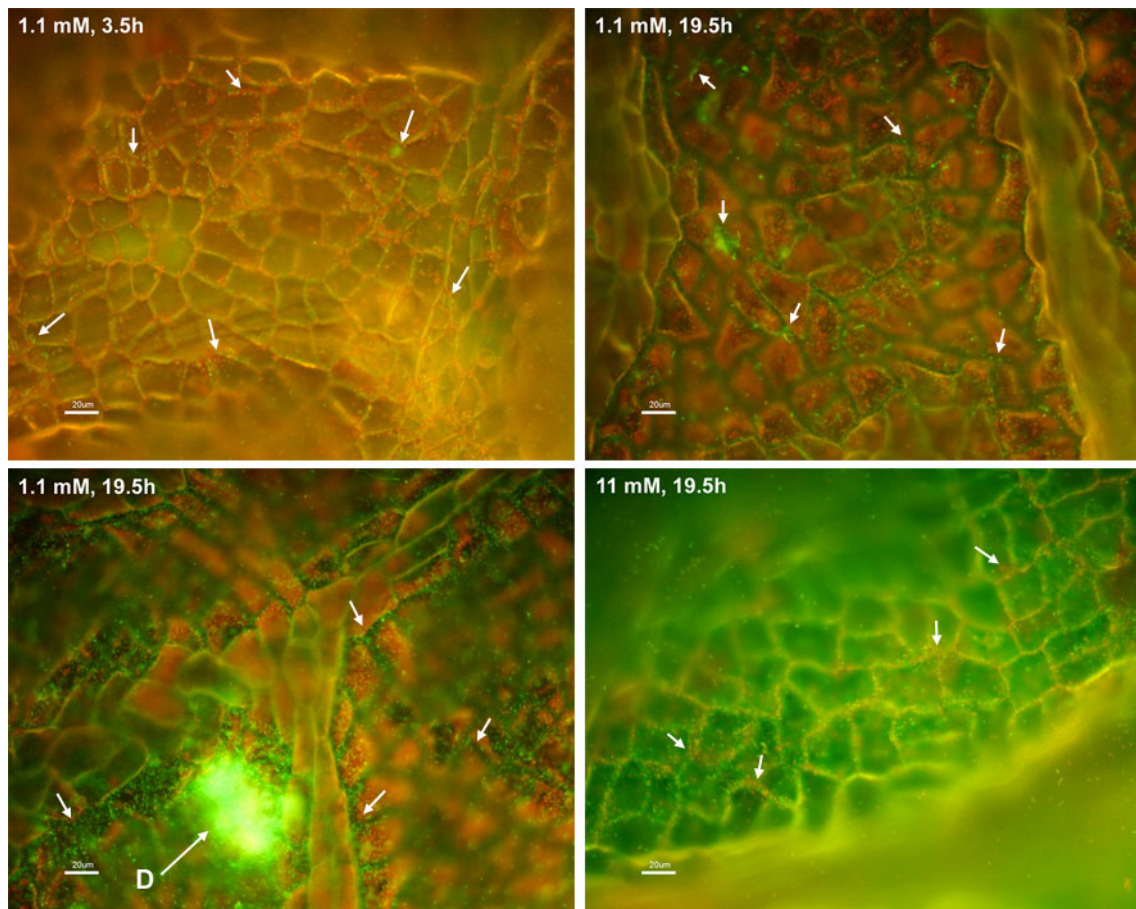


Abbildung 15 Fruktosepermeation über *Juglans*-CM (II)

Die Konzentration der Fruktoselösung und die Inkubationsdauer sind in jedem Bild angegeben. Größenmarker = 20 µm. Die Organismen wurden mit Acridinorange gefärbt; Filtersatz 10. Kleine Pfeile = Stellen an denen GFPB gut zu sehen sind bzw. unten rechts: Stellen an denen kein GFP exprimiert wird. (D) Drüsenansatzstelle.

Die Beobachtung, dass sich die Mikroorganismen bevorzugt entlang der Kutikularleisten ansiedeln, konnte auch bei *Prunus laurocerasus* L. CM gemacht werden.

Fruktoseverfügbarkeit *in vivo* (2.1.3.3)

Lebende Blätter wurden mit dem Bioreporter *Eh299R46* inokuliert. In Abbildung 16 sind Aufnahmen der Blattoberseite von *Juglans* nach 2 h zu sehen. Man kann erkennen, dass die GFPB hauptsächlich entlang der antiklinen Zellwände der Epidermis lokalisiert sind (Abbildung 16, a), zudem lässt sich auch eine starke GFP-Expression entlang der Leitbündel beobachten (Abbildung 16, b).

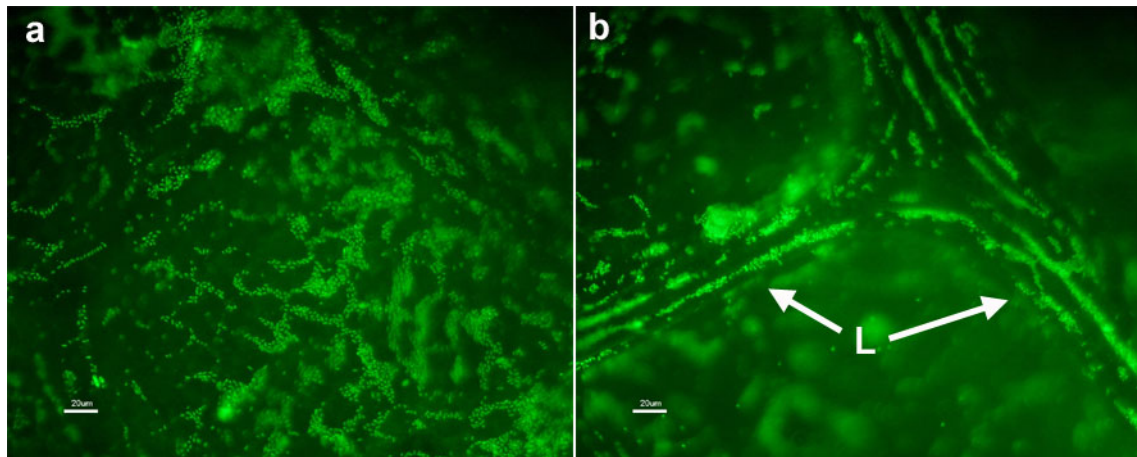


Abbildung 16 Fruktoseverfügbarkeit auf der Blattoberseite von *Juglans*

Die Blätter wurden für 2 h bei 30 °C und 100 % RF inkubiert. Größenmarker = 20 µm. Filter = 09. (L) Leitbündel

Auf der Blattunterseite waren die GFPB entlang der Leitbündel lokalisiert. In den Interkostalfeldern konnten nur wenige GFPB beobachtet werden.

Nach 27 h Inokulation wurden auf der Unterseite hohe Zelldichten, aber nur vereinzelte GFPB beobachtet (keine Abbildung verfügbar).

2.2.2.2 Fruktosepermeabilität

Der Versuch wurde wie in Kapitel 2.1.2.5 beschrieben durchgeführt.

Isolierte *Prunus*-CM wurden in Permeationskammern eingebaut und der Fluss von radioaktiv markiertem Wasser über die CM gemessen. Für alle CM konnten lineare Flüsse gemessen werden. Aus dem Fluss wurde der Ausgangsleitwert P_{Wasser} berechnet. Der Leitwert der 25 Parallelen betrug im Mittel $3.62 \cdot 10^{-10} \text{ m s}^{-1}$, $+ 7.64 \cdot 10^{-11}$, $- 6.30 \cdot 10^{-11}$ (siehe Abbildung 18). Anschließend wurde der Leitwert für Fruktose bei drei verschiedenen Fruktosekonzentrationen bestimmt; für die statistische Auswertung wurden die Fruktoseleitwerte einer log-Transformation unterzogen (Begründung siehe 2.3.2). Auch hier waren die Flüsse linear, allerdings ließ sich mit zunehmender Konzentration eine Abnahme des Flusses beobachten (Abbildung 17), was eine Abnahme der Leitwerte bedeutet (Abbildung 18).

Für den Leitwert von Wasser (Baur 1997) und Fruktose (2.3.2) konnte gezeigt werden, dass diese einer log-normalen Verteilung folgen. Für das Verhältnis der Leitwerte zueinander (= Effekte) konnte jedoch nicht zweifelsfrei gezeigt werden, ob diese normal oder log-normal verteilt sind, daher wurde von der Annahme ausgegangen, dass die Verhältnisse normal verteilt sind.

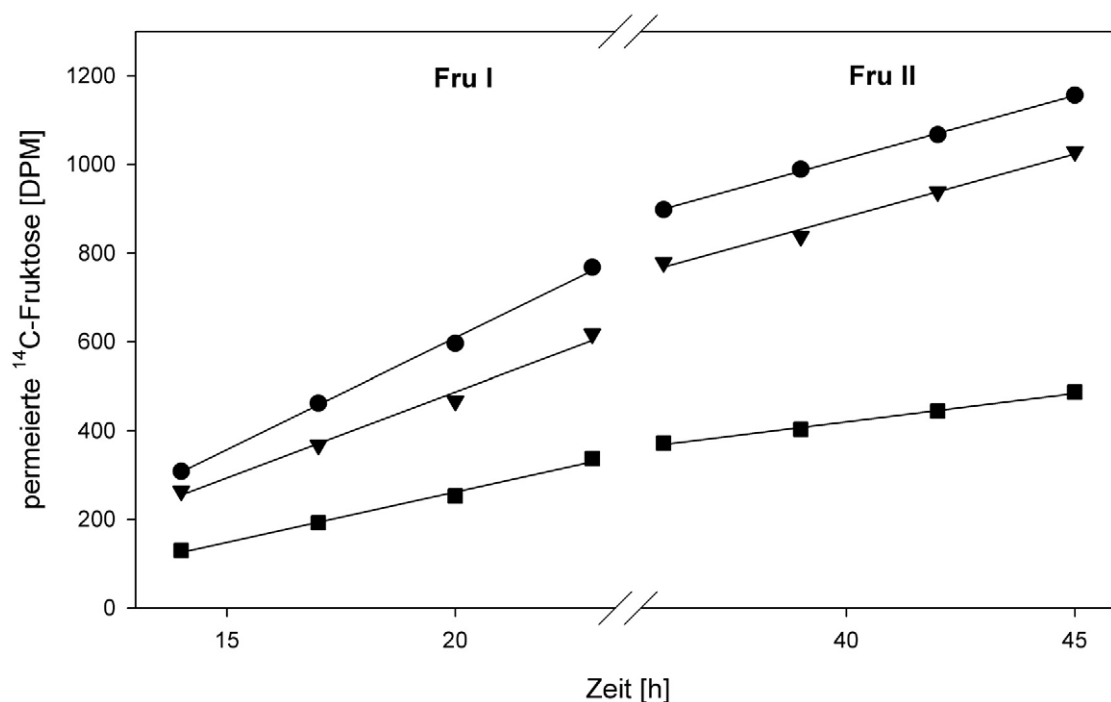


Abbildung 17 Flussdiagramm für drei *Prunus*-CM bei zwei Fruktose-Konzentrationen

Gezeigt sind die Flussverläufe für drei exemplarische CM bei einer Fruktosekonzentration von $3.53 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ (Fru I) und $1.033 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (Fru II).

Bei der Ausgangskonzentration von $3.53 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ betrug der mittlere Leitwert für Fruktose $6.64 \cdot 10^{-11} \text{ m s}^{-1}$, $+ 1.78 \cdot 10^{-11}$, $- 1.41 \cdot 10^{-11}$ (Fru I, $n = 23$). Eine Erhöhung der Fruktosekonzentration auf $1.03 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ resultierte in einem Leitwert von $3.91 \cdot 10^{-11} \text{ m s}^{-1}$, $+ 1.12 \cdot 10^{-11}$,

- $8.70 \cdot 10^{-12}$ (Fru II, $n = 23$). Bei der höchsten Fruktosekonzentration von $1.01 \cdot 10^{-3}$ M betrug der mittlere Leitwert $1.12 \cdot 10^{-11} \text{ m s}^{-1}$, $+ 3.19 \cdot 10^{-12}$, $- 2.49 \cdot 10^{-11}$ (Fru III, $n = 22$).

Alle Leitwerte für Wasser und Fruktose waren auf 95 %-Ebene signifikant von einander verschieden. Das Verhältnis von P_{Wasser} zu $P_{\text{Fru I}}$ betrug im Mittel 6.22 ± 2.02 . Die Erhöhung der Fruktosekonzentration um den Faktor 30 (Fru II : Fru I) führte zu einer Erniedrigung des Leitwertes um den Faktor 0.55 ± 0.07 . Eine weitere, 10fache Erhöhung der Fruktosekonzentration (Fru III : Fru II) bewirkte ein Absinken des Leitwertes auf das 0.35fache ± 0.07 von $P_{\text{Fru II}}$. Bei der Berechnung der Verhältnisse wurden nur die CM berücksichtigt, die bei Fru III berücksichtigt wurden ($n = 20$).

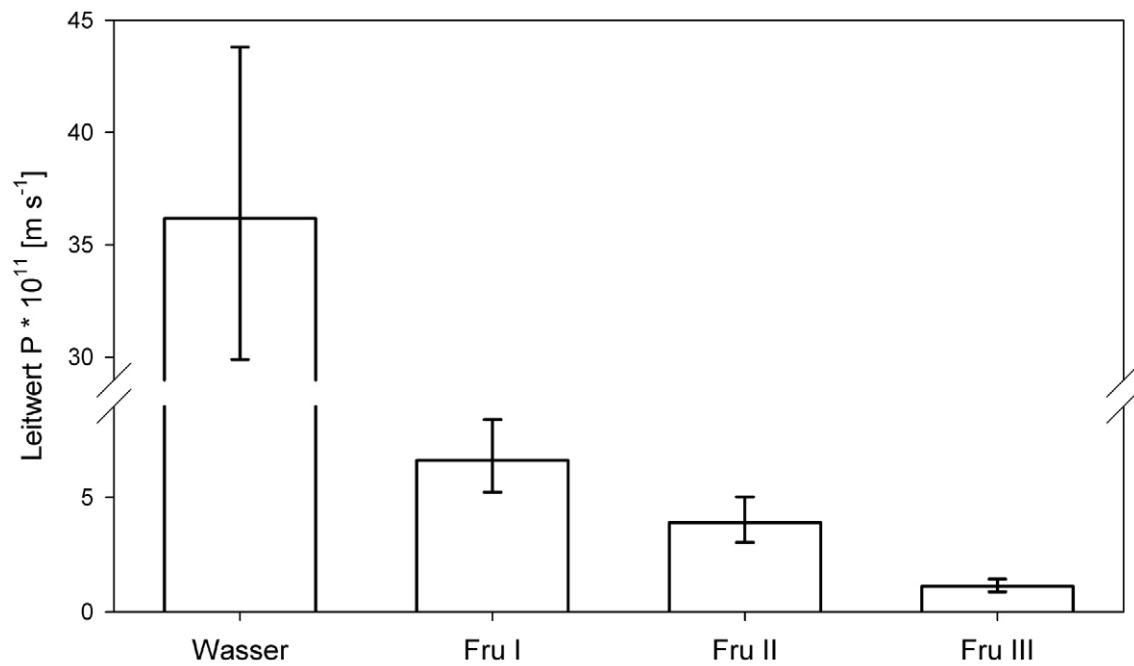


Abbildung 18 Leitwerte für Wasser und Fruktose bei drei Fruktosekonzentrationen

Gezeigt sind die Mittelwerte der log-transformierten Leitwerte und das 95 % Konfidenzintervall. (Wasser) $n = 25$; (Fru I) $c = 3.53 \cdot 10^{-6}$ M, $n = 23$; (Fru II) $c = 1.03 \cdot 10^{-4}$ M, $n = 23$; (Fru III) $c = 1.01 \cdot 10^{-3}$ M, $n = 20$.

2.3 Diskussion

2.3.1 Beeinflussung der kutikularen Permeabilität durch Mikroorganismen

Stark schwankende Wasserverfügbarkeit, insbesondere aber Wassermangel sind ein limitierender Faktor für die Überlebensfähigkeit der Mikroorganismen in der Phyllosphäre (Juniper 1991). Phytopathogene Pilze und Bakterien, aber auch nicht-pathogene Bakterien sind in der Lage die Kutikula zu penetrieren. Die Kutikula ist für Wasser nicht völlig impermeabel, sondern zeigt eine gewisse Durchlässigkeit, die je nach Habitat und Art unterschiedlich hoch sein kann (Schreiber & Riederer 1996, Riederer & Schreiber 2001). Die Wasserpermeabilität der Kutikula kann durch oberflächenaktive Substanzen verändert werden, solche Stoffe werden z. B. bei der Formulierung von Pestiziden und Herbiziden verwendet, um die Wirkstoffe besser an den Wirkort transportieren zu können (Riederer & Schönherr 1990, Baur & Schönherr 1996). Bakterien synthetisieren oberflächenaktive Verbindungen, sog. Biosurfactants; diese setzen sich aus einer Gruppe von Verbindungen zusammen, die aus einer hydrophilen und einer hydrophoben Domäne bestehen und sich auf Grund ihrer amphiphilen Eigenschaft bevorzugt an Grenzflächen anlagern. Bei den Verbindungen handelt es sich u. a. um Glykolipide, Lipopeptide, Polysaccharidkomplexe, Phospholipide, Fettsäuren und neutrale Lipide (Cooper & Zajic 1980, Georgiou et al. 1992). Biosurfactants können die Oberflächenspannung einer Flüssigkeit bzw. die Grenzflächenspannung in einem Zweiphasensystem deutlich erniedrigen (Georgiou et al. 1992). Für Weizen und Polystyren (Bunster et al. 1989), Efeu (Knoll & Schreiber 2000), Walnuss und künstliche Oberflächen (Knoll & Schreiber 1998) konnte gezeigt werden, dass Bakterien aus der Phyllosphäre oberflächenaktive Substanzen produzieren, welche die Benetzbarkeit von künstlichen Oberflächen und der Kutikula verändern können. In dieser Arbeit wurde nun der Frage nachgegangen, ob Mikroorganismen, im speziellen Bakterien, in der Lage sind die Permeabilität der Kutikula für Wasser zu beeinflussen, um so ihr Habitat zu ihren Gunsten zu verändern. Zu diesem Zweck wurde ein Versuchssystem verwendet, das unter Kapitel 2.1.2 beschrieben ist. Die Versuche wurden bei 100 % relativer Luftfeuchte durchgeführt, um die Bakterien lebensfähig zu halten.

In einem Vorversuch, der gemäß den Angaben in Kapitel 2.1.2.2 durchgeführt wurde, jedoch mit radioaktiv markiertem, glukosehaltigem M9-Medium als Donorlösung, wurden *Hedera*-CM mit Flüssigkulturen einer *Pseudomonas*-Art (SaU7) inokuliert. Man konnte die Beobachtung machen, dass die Bakterien die CM penetriert hatten und sich im Donor vermehrten. Da die Flussraten nicht linear waren, sondern zunehmend abflachten (Abbildung 19), kann man schließen, dass durch die vermehrte Anzahl an Bakterien im Donor weniger freies Wasser verfügbar war. Um die Penetration der Kutikula zu vermeiden, wurde in der endgültigen Versuchsanordnung als Donor nur radioaktiv markiertes Wasser verwendet.

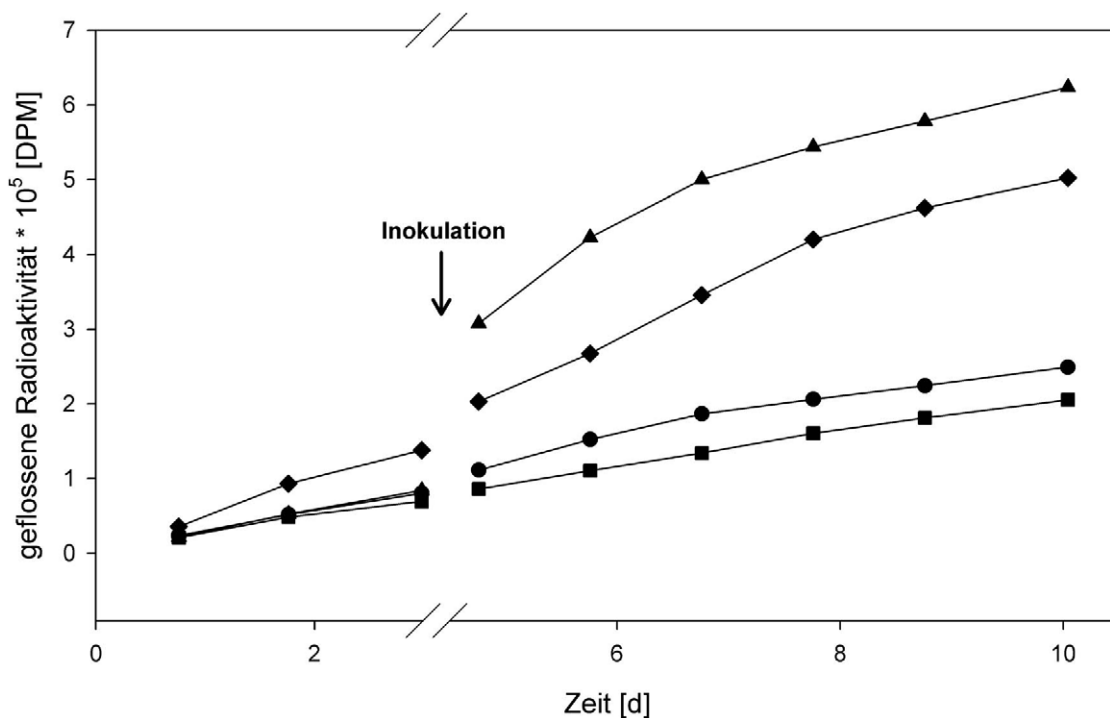


Abbildung 19 Flussdiagramm, *Hedera*-CM vor und nach Inokulation mit *Pseudomonas* sp. (SaU7)

Gezeigt sind 4 Parallelen aus dem Vorversuch mit M9-Medium als Donorlösung. Ab dem 3. Messpunkt nach der Inokulation ist in allen Graphen ein deutliches Abflachen zu erkennen.

Zunächst wurde der Einfluss verschiedener Umweltisolate, die von *Hedera helix* L. Blättern isoliert wurden (Schreiber et al. 2005), auf die Wasserpermeabilität untersucht (2.2.1.1). Der Ausgangsleitwert der *Hedera*-CM aller Versuche betrug im Mittel $2,25 \cdot 10^{-10} \text{ m s}^{-1}$, $+ 9,91 \cdot 10^{-11} \text{ m s}^{-1}$, $- 6,88 \cdot 10^{-11} \text{ m s}^{-1}$ und lag im Bereich der Werte, die in einer Untersuchung zum Einfluss der relativen Luftfeuchte auf Kutikularmembranen und Blattscheiben wurde von Schreiber et al. (2001) bei 100 % RF gemessen wurden. Alle untersuchten Stämme aus den verschiedenen Familien bewirkten eine signifikante Erhöhung der Wasserpermeabilität der Kutikula gegenüber der Kontrolle. Das Spektrum reicht hierbei von 13 % für *Pseudomonas* sp. (SaO3) über 45 % für *Pseudomonas* sp. (SaU6B) bis hin zu 57 % für *Pseudomonas graminis* (SaU5) (Abbildung 7). *Pseudomonas graminis*, das den höchsten Effekt bewirkte, ist ein spezifisches Phyllosphärenbakterium, welches zuerst in der Phyllosphäre von Gräsern beschrieben wurde (Behrendt et al. 1999).

Für Brij® 30, eine hocheffektive oberflächenaktive Substanz, konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der Permeabilität der Kutikula reversibel ist, allerdings konnte der Ausgangswert nicht wieder erreicht werden (Schreiber et al. 1995). In einem Teilversuch dieser Arbeit konnte durch Spülen der CM gezeigt werden, dass die Erhöhung der Wasserpermeabilität durch die Bakterien ein irreversibler Prozess ist (Abbildung 8, Abbildung 20).

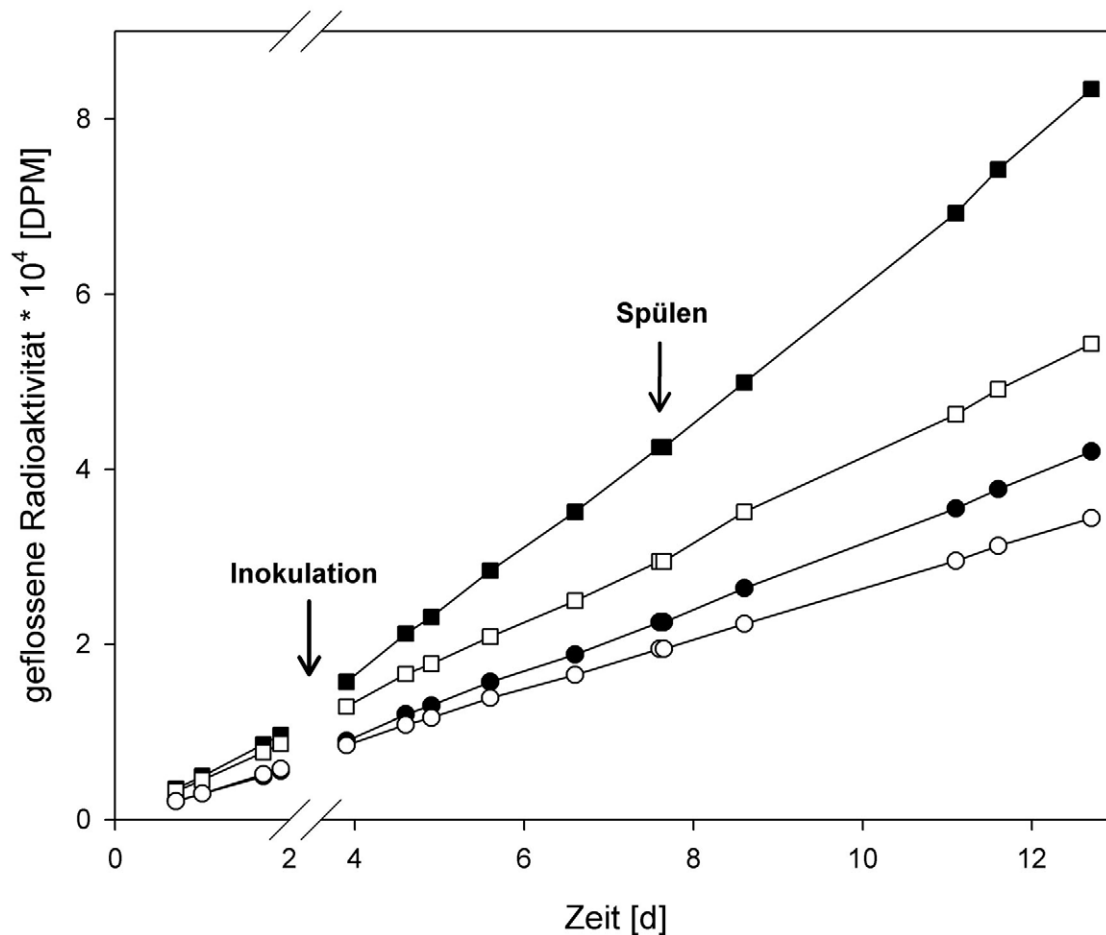


Abbildung 20 Flussdiagramm von $^3\text{H}_2\text{O}$ über *Hedera*-CM, Auswirkung der Inokulation mit Bakterien und anschließendem Spülen der CM

Gezeigt sind ausgewählte Flussverläufe von ■, ● Inokulation mit SaU6B und □, ○ Kontrolle. (□ $E_1 = 0.96$, $E_3 = 1.04$; ○ $E_1 = 0.93$, $E_3 = 0.95$; ■ $E_1 = 1.38$, $E_3 = 1.60$; ● $E_1 = 1.25$, $E_3 = 1.35$)

Zum Teil wurde der Effekt sogar noch erhöht (SaU6B), dies ist aber mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die mechanische Belastung der CM während der Behandlung zurück zu führen. Zudem war die Erhöhung nach dem Spülen bei den Proben am größten, bei denen auch der Effekt am höchsten war. Daraus lässt sich schließen, dass die Substanzen, die die Erhöhung bewirken auch Auswirkungen auf die mechanische Stabilität der Kutikula haben. Die hohe Linearität der Flussverläufe, auch über einen längeren Zeitraum, weisen darauf hin, dass die Veränderung der Permeabilität nur während der Inokulationsphase statt findet. Würden die Bakterien, die sich nach der Inokulation auf der Kutikula etabliert haben permanent eine Veränderung bewirken, so müssten die Flüsse mit der Zeit steigen, d.h. die Steigung steiler werden. Misst man jedoch über einen längeren Zeitraum, so nehmen die Flüsse leicht ab, dies beruht auf der Abnahme der treibenden Kraft. Um nun zu klären ob die Erhöhung der Wasserpermeabilität durch die Bakterien an sich, oder durch Metabolite, die sie in das Medium abgeben, verursacht wird, wurden in einem neuen Versuchsansatz die Bakterien vom Medium isoliert und getrennt appliziert (2.1.2.3).

Im Rahmen meiner Diplomarbeit hatte ich bakterielle Epiphyten auf Erdbeere identifiziert (Krimm 2001). Dabei wurde der Stamm Fa4 isoliert, der zuerst als *Pseudomonas graminis* identifiziert wurde, 2003 wurde jedoch ein neuer *Pseudomonas*-Stamm aus der Rhizosphäre von Gräsern als *Pseudomonas rhizosphaerae* beschreiben, mit dessen 16S rDNA Fa4 eine höhere Übereinstimmung zeigt. *P. rhizosphaerae* ist ein naher Verwandter von *P. graminis*, ist jedoch in der Lage Phosphor zu solubilisieren (Peix et al. 2003). In einem ersten Vorversuch zeigte er einen ähnlich hohen Effekt wie *P. graminis*, daher wurden die folgenden Versuche mit *P. rhizosphaerae* durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

Zunächst wurde *P. rhizosphaerae* in einem Modellversuch auf *Prunus*-CM getestet. *Prunus*-CM wurden als Modellsystem gewählt, da sie leicht in großen Mengen zu isolieren und im Versuch verwendbar sind, zudem gibt es bereits einige Studien zu *Prunus laurocerasus*, die zum Vergleich herangezogen werden können (Schreiber et al. 1995, Schreiber & Riederer 1996, Kirsch et al. 1997, Niederl et al. 1998, Schreiber 2001, Schreiber et al. 2001).

Der Ausgangsleitwert der *Prunus*-CM betrug im Mittel $8.73 \cdot 10^{-10} \text{ m s}^{-1}$ ($+ 2.00 \cdot 10^{-10}$, $- 1.63 \cdot 10^{-10}$) und lag damit um 30 % höher als bei Schreiber et al. (2001) für CM von alten Blättern beschrieben. Bei den in dieser Arbeit verwendeten CM handelte es sich in der Tat um CM von alten *Prunus* Blättern. Da die CM aber durchweg lineare Flussverläufe aufwiesen, wurde der Versuch fortgesetzt. Die Kontrollen mit M9-Medium und PBS zeigten keine von der H₂O-Kontrolle signifikant verschiedenen Effekte. Auch die Inokulation mit 10^{10} Zellen in PBS bewirkte keine von der Kontrolle signifikant abweichende Veränderung der Wasserpermeabilität. Ausschließlich die Inokulation mit sterilem Kulturüberstand von Zellkulturen unterschiedlicher Zelldichte bewirkte eine signifikante Erhöhung der Effekte. Die maximale Erhöhung der Permeabilität betrug 62 %. Es konnte eine starke Korrelation zwischen der Zellzahl der Ausgangskultur und dem mittleren Effekt festgestellt werden ($r^2 = 0.996$). Dadurch lässt sich beweisen, dass die Effekte durch Metabolite der Bakterien hervorgerufen werden. Auch für *P. rhizosphaerae* auf *Prunus*-CM wurde die Reversibilität des Effektes getestet. Nach dem Spülen ließ sich nur eine leichte Steigerung der Permeabilität messen (Abbildung 10). Diese beruht wahrscheinlich auf Veränderungen in der Struktur der Kutikula durch die bakteriellen Metabolite, die durch die mechanische Belastung während der Behandlung zu einer stärkeren Veränderungen führten als bei den Kontrollen.

Nachdem die Effektivität von *P. rhizosphaerae* im *Prunus*-Modell gezeigt werden konnte, wurde *P. rhizosphaerae* auch auf intakten Erdbeerblattscheiben (*in vivo*) getestet, um zu zeigen, dass der Effekt auch auf der Ursprungspflanze auftritt (2.1.2.4). Der Ausgangsleitwert der LD betrug im Mittel $1.46 \cdot 10^{-9} \text{ m s}^{-1}$ ($+2.19 \cdot 10^{-10}$, $- 1.90 \cdot 10^{-10}$) und lag damit im Bereich der Leitwerte, die für laubabwerfende Arten gemessen wurden, welche von $1.55 \cdot 10^{-9}$ bis $4.02 \cdot 10^{-9} \text{ m s}^{-1}$ für *Ginkgo biloba* L. bzw. *Juglans regia* L. reichen (Niederl et al. 1998). Auch auf *Fragaria*-Blattscheiben hatte die Inokulation mit gewaschenen Zellen in PBS keinen signifikanten Effekt auf

die Wasserpermeabilität, die Inokulation mit sterilem Kulturüberstand (10^8 Zellen) führte jedoch zu einer signifikanten Erhöhung um 38 % (Abbildung 11).

Insgesamt liefern die verschiedenen Versuche ein einheitliches Gesamtbild:

- Verschiedene Bakterien, die von Pflanzen isoliert wurden, können Substanzen produzieren und in die Umwelt abgeben, die die Permeabilität der Kutikula für Wasser erhöhen.
- Es handelt sich hierbei um einen irreversiblen Effekt.

Bakterien in der Phyllosphäre sind also in der Lage die Permeabilität der Kutikula für Wasser zu erhöhen, um somit ihre Überlebenschancen zu erhöhen. Über die Art der effektiven Substanzen und die Mechanismen liegen derzeit noch keine Informationen vor.

2.3.2 Fruktosepermeabilität

Neben der Wasserverfügbarkeit ist auch die Nährstoffverfügbarkeit ein wichtiges Kriterium für das Überleben von Mikroorganismen in der Phyllosphäre. In dieser Arbeit wurde folgenden Fragestellungen nachgegangen:

- Wie permeabel ist die Kutikula für Kohlenhydrate?
- Ist die Permeabilität für die gesamte Blattoberfläche homogen, oder gibt es Stellen höherer Permeabilität?
- Wie viele Bakterien können anhand der ermittelten Daten theoretisch auf Blattoberflächen siedeln?

Zunächst wurde die räumliche Zuckerverfügbarkeit mit einem Bioreporter sichtbar gemacht, anschließend wurde die Permeation von Fruktose als Modell-Kohlenstoffquelle über isolierte CM gemessen.

Mit Hilfe des Bioreporters *Eh299R46* konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass Fruktose die Kutikula permeiert (2.2.2.1). Der Bioreporter ist so konstruiert, dass GFP erst dann exprimiert wird, wenn Fruktose in die Bakterienzelle aufgenommen wurde und Fruktose-1-Phosphat, das erste Zwischenprodukt des Fruktoseabbaus, entstanden ist (Abbildung 21, Leveau & Lindow 2001, Lindow & Leveau 2002). Bei *in vivo*-Experimenten ist allerdings zu beachten, dass der Bioreporter auch durch die Aufnahme von Saccharose zur GFP-Expression induziert wird, allerdings ist die Fluoreszenz hier etwa halb so stark. Es wurde ein modifiziertes GFP [AAV] verwendet, das schneller gebildet wird, stärker fluoresziert und eine reduzierte Stabilität hat, welches eine Echtzeitbeobachtung der Genexpression und somit der Fruktosemetabolisierung ermöglicht. Dieser

Bioreporter ermöglicht zudem eine Quantifizierung, die jedoch in dieser Untersuchung nicht durchgeführt wurde.

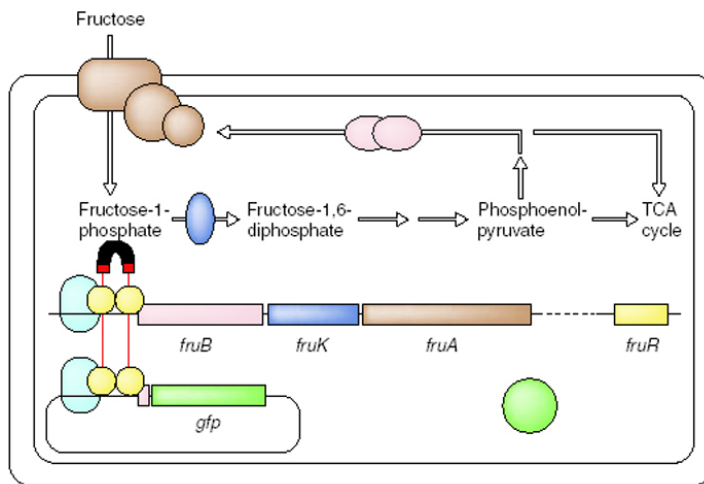


Abbildung 21 Funktionsweise des Bioreporters Eh299R46

(aus Lindow & Leveau 2002) Fructose wird durch das *fruB/fruA* codierte Transferase-System, als Fructose-1-phosphat in die Zelle transportiert. Die Umwandlung in Fructose-1,6-bisphosphat wird durch das Produkt von *fruK* katalysiert. Das *fruBKA*-Operon wird negativ durch das Produkt des *fruR*-Genes gesteuert. In Gegenwart von Fructose induziert das *fruR*-Protein die *fru*-Expression. Durch Kopplung der *fruR*-Bindungsregion an das *gfp*-Gen akkumuliert die Zelle GFP in Relation zur Fructosemetabolisierung.

Zunächst wurde im *in vitro*-Modell die Permeation der Fructose über isolierte Kutikularmembranen untersucht. Sowohl für *Juglans*- als auch *Prunus*-CM konnte eine Lokalisierung der GFP exprimierenden Bioreporter entlang der Kutikularleisten beobachtet werden. Bei *Juglans* wurden zudem auch Bereiche höherer Fructosepermeabilität an Drüsenansatzstellen gefunden (Abbildung 14, Abbildung 15). Die Untersuchung an intakten Blättern lieferte ein ähnliches Resultat, allerdings konnten bei diesem Versuch bei *Juglans* keine Drüsenzellen beobachtet werden. Die Lage von fluoreszierenden Bakterien in den Vertiefungen zwischen den Epidermiszellen, in der Nähe von Blatthaaren und auf bzw. neben Blattadern wurde auch von Leveau & Lindow (2001) in der Phyllosphäre von *Phaseolus vulgaris* beschrieben. In direkter Nähe zu Blattadern ist die Konzentration an Kohlenhydraten vermutlich größer, da diese im Phloemsaft zwischen 0.25 und 1.5 M liegt (Lüttge et al. 1994), im Vergleich zu ca. 300fach niedrigeren Konzentrationen im Apoplasten (Schönherr & Baur 1996). Bei den Kohlenhydraten im Phloem handelt es sich hauptsächlich um Saccharose (Lüttge et al. 1994), welche ebenfalls eine GFP-Expression induziert. Bei der Beurteilung der Lage der GFPB ist zu beachten, dass nicht nur der Stimulus heterogen über die Untersuchungsfläche verteilt sein kann, sondern auch günstige Wachstumsbedingungen für den Bioreporter. Keine GFP-Expression an einer Stelle kann zur Ursache haben, dass an jener Stelle zwar ausreichend Fructose vorhanden ist, aber ansonsten ungünstige Bedingungen herrschen (z. B. Wasserstress, Toxine) (Leveau & Lindow 2002). In den Untersuchungen an isolierten CM konnten über den gesamten Versuchszeitraum fluoreszierende Bakterien detektiert werden, zudem ließ sich eine Zunahme der GFPB mit steigender Fructosekonzentration im Donor beobachten. Die Fructosekonzentrationen wurden so gewählt, dass sie in etwa der Konzentration im Apoplasten von 0.01 - 10 mM entsprachen (Schönherr & Baur 1996). Teilweise ist das Ergebnis nicht immer uniform, was sich aber dadurch erklären lässt, dass es sich hierbei nicht um dieselbe CM handelte.

Die CM stammten zwar aus der gleichen Charge, jedoch besitzen sie immer eine gewisse Variabilität. Bei *Juglans* gibt es offensichtlich CM, die fast ausschließlich an Drüsenansatzstellen permeabel sind, wohingegen andere auch entlang der Kutikularleisten permeabel sind. So konnte für Fruktose gezeigt werden, dass die Kutikula nicht gleichmäßig permeabel ist, sondern im Bereich der Kutikularleisten eine höhere Permeabilität für Fruktose vorliegt. Der Kutikularleistenbereich beträgt je nach Art zwischen 50 und 70 % der Fläche (Abbildung 22). Beschränkt man den Bereich ausschließlich auf die Kutikularleisten, so wären nur 25 - 35 % der Kutikula permeabel.

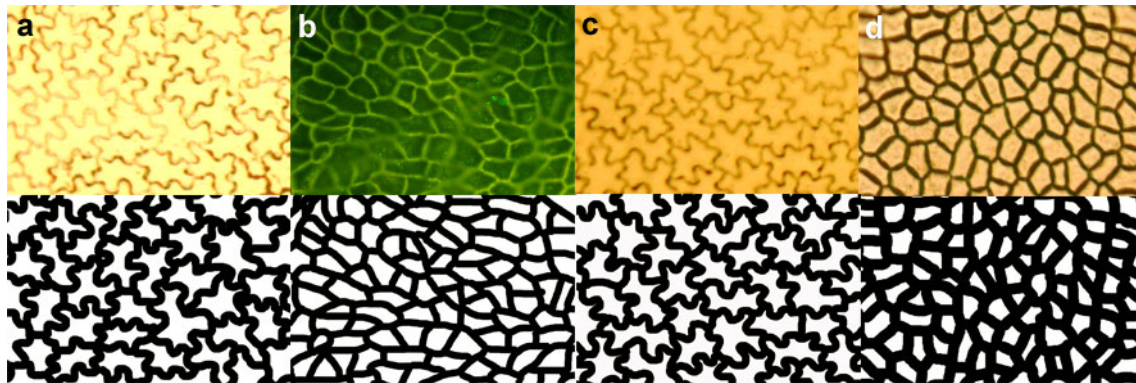


Abbildung 22 Permeable Bereiche bei verschiedenen Arten

(a) *Prunus laurocerasus* L., 54 %; (b) *Juglans regia* L., 55 %; (c) *Vinca major* L., 53 %; (d) *Malus* sp., 70 %. In der oberen Reihe ist eine mikroskopische Aufnahme der Kutikula (je 300 x 200 µm) zu sehen, darunter in schwarz der Bereich, der durch die Kutikularleisten festgelegt wird. Die Breite der Kutikularleiste wurde ausgemessen, in Photoshop® mit einem Strich doppelter Stärke nachgezeichnet und die belegte Fläche ausgemessen.

Nachdem die Fruktoseverfügbarkeit sichtbar gemacht werden konnte, wurde der tatsächliche Leitwert für Fruktose im CM-Modellversuch ermittelt.

Ebenso wie für Wasserpermeabilität (Baur 1997) konnte auch für die Fruktosepermeabilität gezeigt werden, dass diese einer log-normalen Verteilung folgt (Abbildung 23). Dies konnte für alle drei Fruktosekonzentrationen gezeigt werden, daher erfolgte die statistische Auswertung der Daten nach log-Transformation.

Die in dieser Arbeit gemessene Fruktosepermeabilität von *Prunus*-CM lag mit $1.12 - 6.64 \cdot 10^{-11} \text{ m s}^{-1}$ um zwei Größenordnungen niedriger als die von Stammitti und Kollegen (1995) gemessenen Werte von $0.52 - 2.34 \cdot 10^{-9} \text{ m s}^{-1}$. Da diese keine Angaben über die Wasserpermeabilität der verwendeten CM geben, lässt sich nicht beurteilen welche Qualität die CM hatten. Auch über die Versuchstemperatur, die ebenfalls einen Einfluss auf die kutikulare Permeabilität hat (Schreiber 2001), wurden keine Angaben gemacht. In einem Vorversuch für diese Arbeit wurde, wie in Kapitel 2.1.2.5 beschrieben, die Fruktosepermeabilität an *Prunus*-CM gemessen, die einen ca. 10fach höheren Wasserleitwert besaßen als in der Literatur für *Prunus*-CM bei 100 % RF bzw. flüssigem Wasser angegeben ($5 \cdot 10^{-10} \text{ m s}^{-1}$, Schreiber et al. 2001).

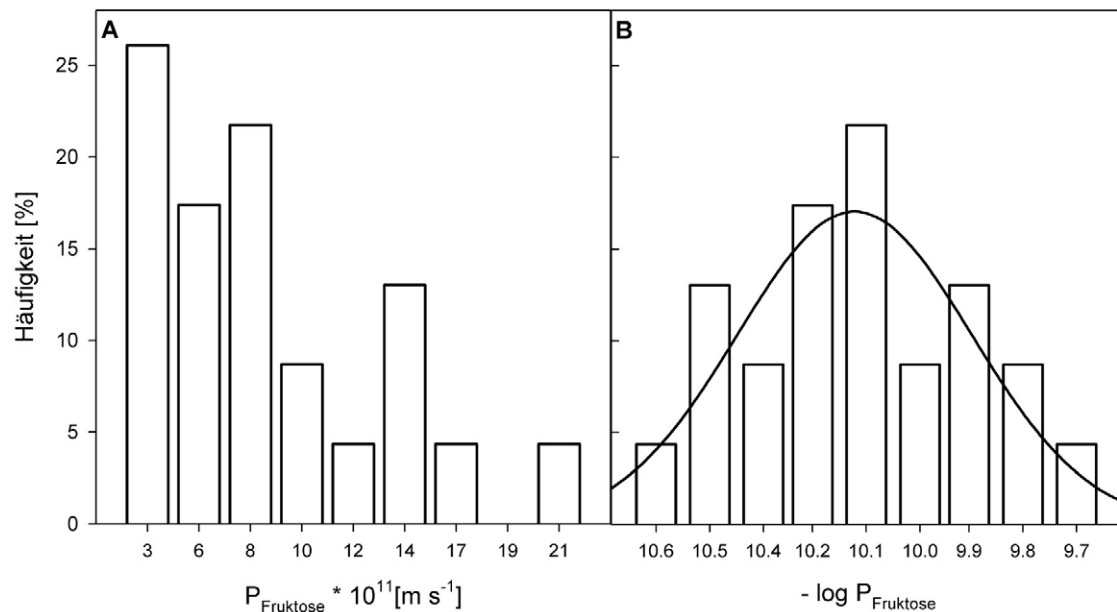


Abbildung 23 Prozentuale Häufigkeitsverteilung der Leitwerte für Fruktose vor (A) und nach (B) log-Transformation

Gezeigt sind die Werte von Fru I (n = 23). Die Werte von Fru II und Fru III lieferten ähnliche Ergebnisse.

Für diese CM wurde bei einer Fruktosekonzentration von $5 \cdot 10^{-3}$ M ein Leitwert von $1.80 \cdot 10^{-10} \text{ m s}^{-1}$ gemessen, der um eine Größenordnung niedriger war als von Stammitti et al. gemessen. Da die Wasserpermeabilität so ungewöhnlich hoch war, wurde der Versuch mit *Prunus*-CM wiederholt, deren Wasserpermeabilität im Bereich der Literaturwerte lagen. Stammitti et al. treffen keine Aussage über das Alter der verwendeten Blätter. Für *Hedera helix* L. (Hauke & Schreiber 1998), *Prunus laurocerasus* L. (Schreiber et al. 2001) und auch für *Juglans regia* L. (3.2.5) wurde bei voll expandierten Blättern mit zunehmendem Blattalter eine Zunahme der Wasserpermeabilität festgestellt. Nach der enzymatischen Isolierung wurden die CM von Stammitti und Kollegen mit einer Bürste mechanisch von Zellresten befreit. Dabei könnte die Struktur der Kutikula mechanisch beschädigt worden sein; so entstandene Mikroperforationen könnten eine weitere Ursache für die hohe Zuckerpermeabilität sein.

Die Fruktosepermeabilität bei der niedrigsten Konzentration war im Mittel 6mal niedriger als die Wasserpermeabilität. Trägt man jedoch die Einzelwerte gegeneinander auf (Abbildung 24), so lässt sich nur ein sehr schwacher linearer Zusammenhang erkennen ($r^2 = 0.1167$), der auf unterschiedliche Transportwege über die Kutikula hindeutet. Niederl et al. (1998) konnten hingegen in Co-transport-Experimenten von $^3\text{H}_2\text{O}$ und ^{14}C -markierten organischen Säuren einen linearen Zusammenhang zeigen und leiteten daraus einen Transport über gleiche Wege ab.

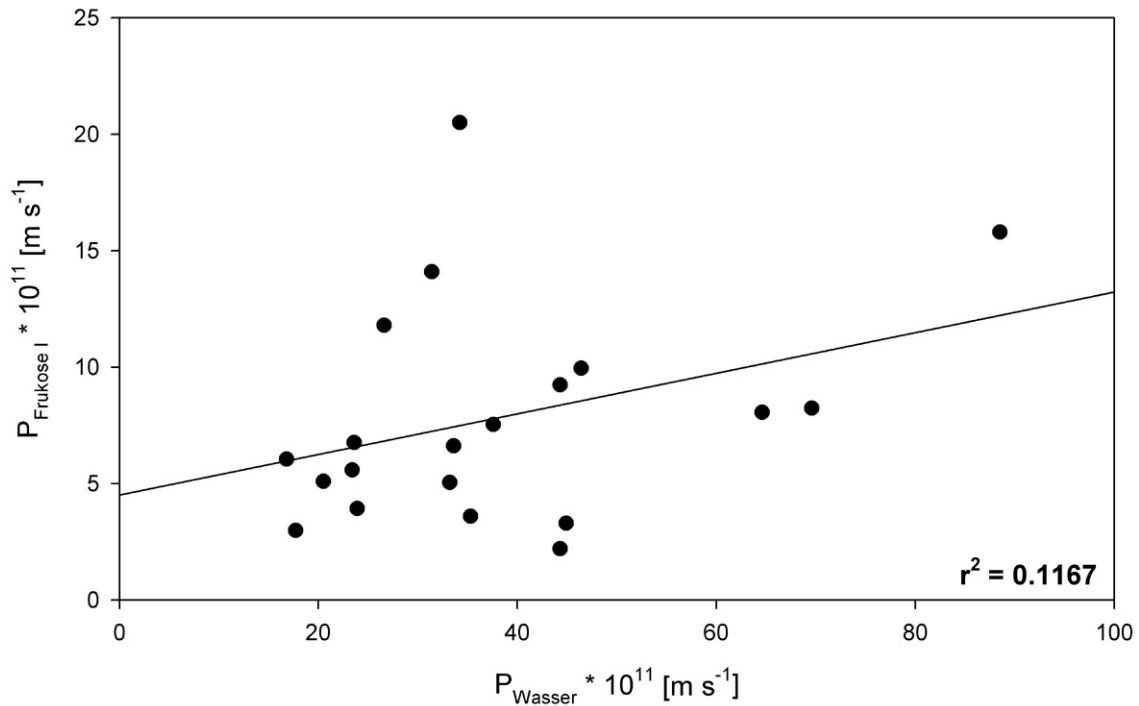


Abbildung 24 Fructose-Leitwerte im Vergleich zu Wasserleitwerten

Gezeigt sind nur die Werte der CM, die bei Fru III berücksichtigt wurden (N = 20).

Auch der Vergleich der Fructosepermeabilität bei unterschiedlichen Fructosekonzentrationen zeigt, dass hier deutliche Schwankungen innerhalb der Parallelen auftreten können (Abbildung 25); es lässt sich jedoch schwach ein linearer Zusammenhang erkennen.

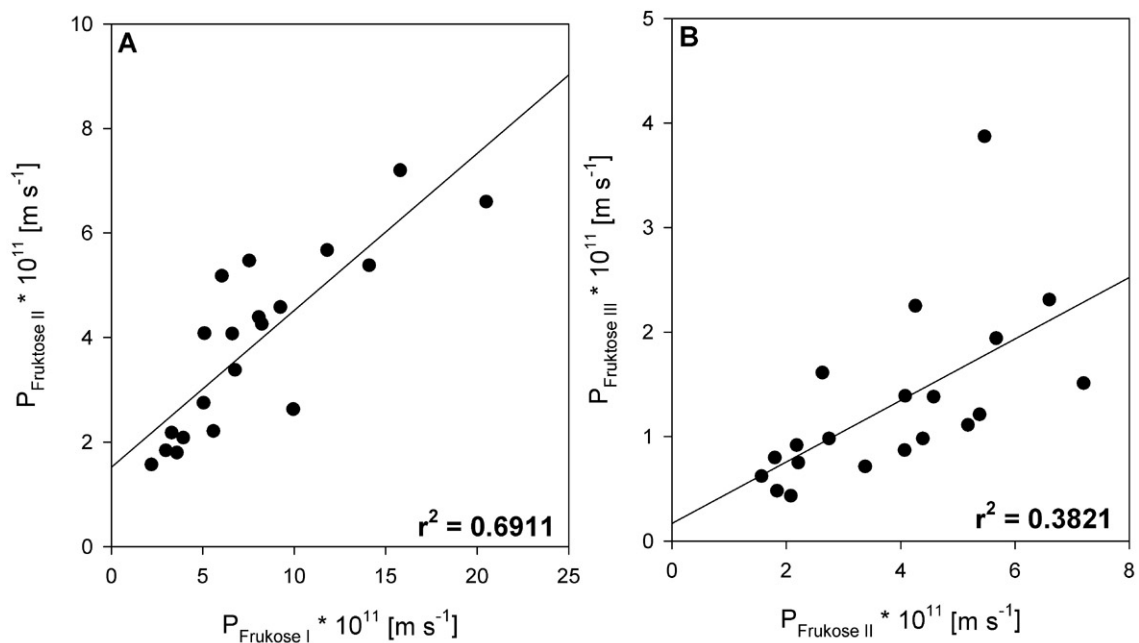


Abbildung 25 Fructose-Leitwerte im Vergleich zueinander

(A) Fru II : Fr I. Mittleres Verhältnis 0.546 ± 0.071 . (B) Fru III : Fr II. Mittleres Verhältnis 0.345 ± 0.066 . Gezeigt sind nur die Werte der CM, die bei Fru III berücksichtigt wurden (N = 20).

Entsprechend der Ergebnisse mit anderen Substanzen (Schreiber et al. 1995, Niederl et al. 1998) hätte man einen konzentrationsunabhängigen Leitwert erwartet, die Fruktosepermeabilität sinkt aber exponentiell mit zunehmender Fruktosekonzentration im Donor (Abbildung 26). Dies beruht wahrscheinlich auf einer sterischen Hinderung der Zuckermoleküle, die mit steigender Konzentration zunimmt, dadurch sinkt der Leitwert scheinbar. Tatsächlich steigen die Flüsse mit steigender Konzentration dennoch an, allerdings nicht proportional zur Konzentration. Bei einer Konzentration von $3.53 \cdot 10^{-6}$ M betrug der Fruktosefluss $5.39 \text{ g s}^{-1} \text{ m}^{-2}$; nach einer 285fachen Erhöhung stieg der Fluss nur auf das 74fache an.

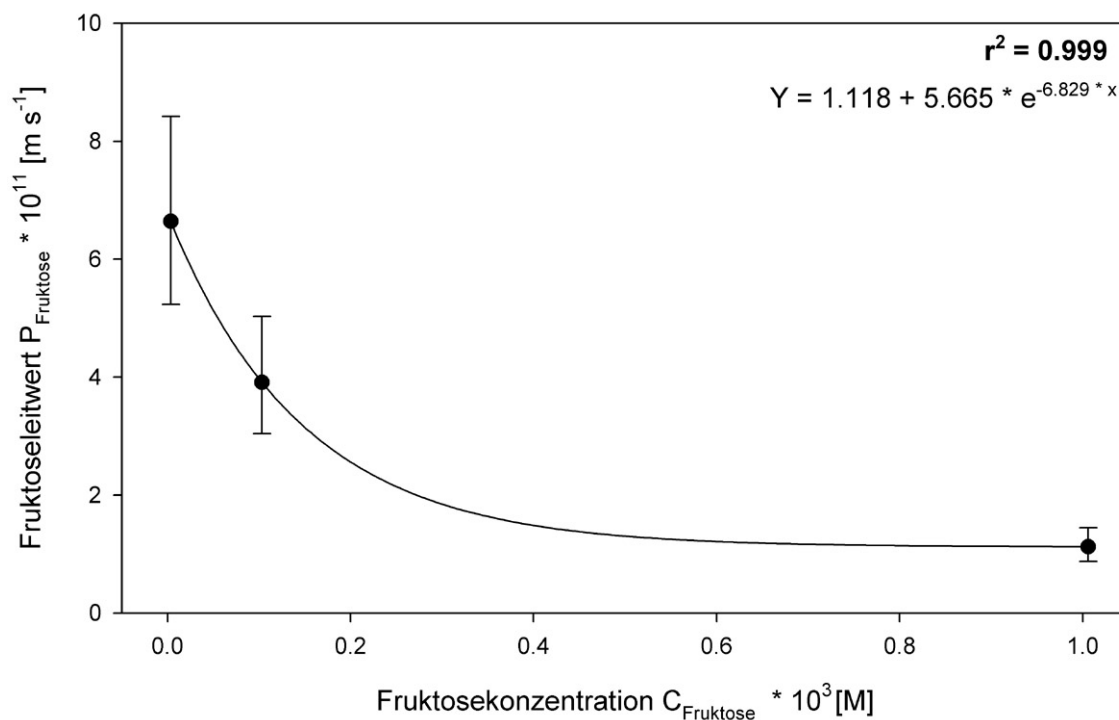


Abbildung 26 Zusammenhang zwischen der Fruktosekonzentration im Donor und dem gemessenen Leitwert

Aufgetragen sind die Mittelwerte der Leitwerte bei drei verschiedenen Konzentrationen gegen die jeweilige Konzentration im Donor. Die Fehlerbalken zeigen das 95 % Konfidenzintervall. Der Graph wurde mit SigmaPlot gerechnet.

Letztendlich sollte noch die Frage geklärt werden, ob die gemessenen Flüsse ein mikrobielles Wachstum ermöglichen und wie viele Bakterien theoretisch auf der Blattoberfläche leben könnten. Viele Bakterienstämme, die in der Phyllosphäre gefunden wurden, haben eine Größe von $3 \times 1 \mu\text{m}$ (Krimm 2001). Wenn man nun vereinfacht davon ausgeht, sie seien quaderförmig und besäßen eine Dichte von 1, so errechnet sich für ein Bakterium ein Feuchtgewicht von $3 \cdot 10^{-12}$ g. Bakterien haben einen Trockengewichtsanteil von 30 %; der Kohlenstoffanteil daran beträgt 50 % (Madigan et al. 2000). Um sich in 24 h zu verdoppeln, benötigt ein Bakterium also $4.5 \cdot 10^{-13}$ g Kohlenstoff d^{-1} . Bei dieser Abschätzung wird der benötigte Kohlenstoffverbrauch für die Deckung des Energiebedarfes vernachlässigt. Bei der niedrigsten Fruktosekonzentration flossen in 24 h

$3.64 \cdot 10^{-10}$ g Fruktose cm^2 , die ein Verdoppeln von ca. 800 Bakterien pro cm^2 ermöglichen würden. Bei der höchsten gemessenen Konzentration von $1 \cdot 10^{-3}$ M würde die geflossene Fruktosemenge von $1.76 \cdot 10^{-8}$ g cm^2 eine Verdoppelung von ca. 39 000 Bakterien pro cm^2 ermöglichen. Ausgehend von der Annahme, dass der exponentielle Zusammenhang zwischen Donorkonzentration und Leitwert zuträfe, lässt sich aus der Formel in Abbildung 26 der Leitwert für nicht gemessene Fruktosekonzentrationen berechnen. Schönherr und Baur (1996) errechnen für die Verdopplung einer Population von 10^6 Bakterien pro cm^2 einen Kohlenhydratfluss von 1.74 g Kohlenhydrat $\text{s}^{-1} \text{m}^2$, welches 1.5 g Kohlenhydrat cm^2 in 24 h entspricht. Für diesen Fluss berechneten sie anhand von Verteilungskoeffizienten eine Mindestkonzentration von 0.2 M für Kohlenhydrate. Da in der Literatur die Kohlenhydratkonzentration im Apoplasten mit $0.01 - 10 \cdot 10^{-3}$ M angegeben wurde, schlossen sie, dass die Kutikula für Kohlenhydrate nicht ausreichend permeabel ist, um die gemessenen Zellzahlen zu ermöglichen. Aus den Berechnungen in dieser Arbeit ergibt sich jedoch bei einer Konzentration von $8.65 \cdot 10^{-3}$ M der geforderte Fluss. Die Fruktosepermeabilität der Kutikula ist somit ausreichend hoch, um die in der Literatur beschriebenen Zellzahlen mit Nährstoffen zu versorgen. Schönherr und Baur bemerken außerdem, dass die Bakterien in dieser Dichte nur einen geringen Teil der Gesamtoberfläche der Kutikula belegen und somit für sie räumlich bedingt nur ein Bruchteil der Kohlenhydrate verfügbar ist. Da die Organismen sich aber nicht statistisch über die gesamte Oberfläche verteilen, sondern bevorzugt in Bereichen höherer Permeabilität siedeln (Abbildung 37 bis Abbildung 43, Abbildung 14 und Abbildung 15), können sie einen großen Teil der verfügbaren Ressourcen ausschöpfen.

3 **UNTERSUCHUNGEN ZU *JUGLANS REGIA* L.**

3.1 **Material und Methoden**

3.1.1 **Chemikalien**

Die Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben von Fluka (Schweiz), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) oder Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) in analysenreiner Form bezogen.

3.1.2 **Pflanzenmaterial (*Juglans regia* L.)**

Juglans regia L., die Walnuss, ein Holzgewächs aus der Familie der Juglandaceae (Abteilung Spermatophyta, Klasse Dicotyledonae, Unterklasse Hamamelididae, Ordnung Juglandales, Familie Juglandaceae), ist eine Kulturpflanze, die ursprünglich aus dem Balkan und Asien kommt (Senghas & Seybold 2000). Die bis zu 25 m hohen Bäume werden zur Holzgewinnung und wegen ihrer Nüsse angebaut. Die Blätter sind meist 3 – 4 fiedrig und nur auf der Unterseite in den Nervenwinkeln behaart.

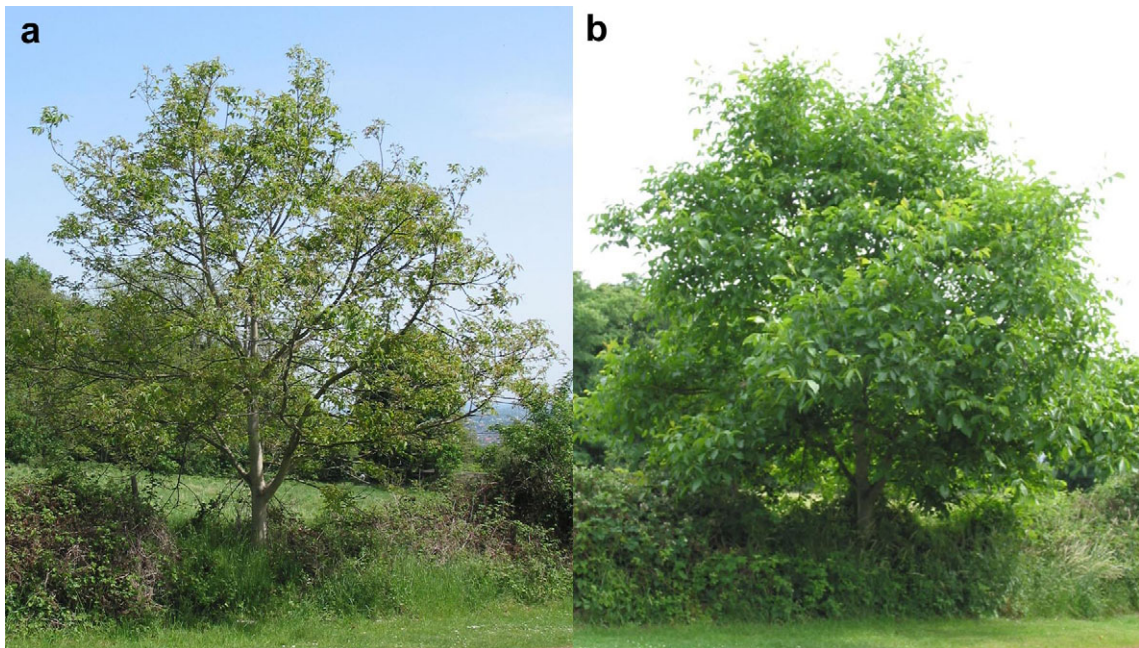


Abbildung 27 *Juglans regia* L.

Der Versuchsbaum am Standort in der Kreuzbergallee, Bonn - Poppelsdorf. a) 06.05.2003, ca. 3 Wochen nach dem ersten Austrieb; b) 10.06.2003, in voller Belaubung.

Für die verschiedenen Untersuchungen wurden nur die basalen Blätter der Triebe des jeweiligen Jahres geerntet; somit wurde sichergestellt, dass die Blätter annähernd zur gleichen Zeit ausgetrie-

ben hatten. Es wurden nur gesund erscheinende Blätter von der Nord-West-Seite des Baumes aus einer Höhe von 1 – 2 m über dem Boden verwendet.

3.1.3 Rasterelektronenmikroskopie

Die Blätter wurden morgens geerntet und sofort weiter verarbeitet. Aus zwei Blättern (für die Untersuchung der Ober- und Unterseite) wurde aus der Blattmitte ein Segment ausgeschnitten, aus dem 3 ca. 1 cm² große Quadrate vom Rand, aus der Blattmitte und direkt neben der Mittelrippe ausgeschnitten wurden. Diese wurden mit doppelseitigem Klebeband auf einem Probenhalter fixiert. Um die Leitfähigkeit zu erhöhen, wurden die Ecken der Proben mit Leitpaste mit dem Probenhalter verbunden. Die Frischproben wurden anschließend ohne chemische Fixierung bei 150 V und 65 mA für 30 s mit Gold bedampft (SCD 040, Bal-Tec AG, Schweiz). Die Proben wurden mit dem Rasterelektronenmikroskop LEO 1450 (Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen) bei 15 kV Kathodenspannung und einem Kippungswinkel von 45° untersucht.

3.1.4 Evaluierung des Isolationsmediums

Um das Medium zu finden, das am besten für die Auszählung der CFU geeignet ist, wurden fünf verschiedene Medien getestet. Die Organismen wurden wie unter 3.1.5 beschrieben isoliert und auf fünf verschiedenen Medien kultiviert.

Tabelle 2 Medien für die Evaluierung der maximalen CFU-Bildung

Medium	Zusammensetzung	Hersteller
TSA (Tryptikase Soja Agar)	30 g TSB (57 % pankreatisch abgebautes Casein, 10 % papainisch abgebautes Sojamehl, 17 % NaCl, 8 % K ₂ HPO ₄ , 8 % Glukose), 15 g Agar ad 1 l	Becton Dickinson Microbiology Systems, USA
10 % TSA	3 g TSA, 15 g Agar ad 1 l	Becton Dickinson Microbiology Systems, USA
LB (Luria Bertani)	20 g LB (50 % Trypton, 25 % Hefeextrakt, 25 % NaCl) 12 g Agar ad 1 l.	Fluka, Schweiz
10 % LB	2 g LB, 12 g Agar ad 1 l	Fluka, Schweiz
King B	33 g King B (60 % Peptonmix, 5 % K ₂ HPO ₄ , 5 % MgSO ₄ , 30 % Agar) ad 1 l; nach dem Autoklavieren 10 ml Glycerin dazugeben	Fluka, Schweiz

Die Medien wurden bei 121 °C für 20 Min autoklaviert (Tischautoklav, Astell Scientific Ltd., England). Jedem Medium wurde Actidion (30 mg l⁻¹) zugesetzt, um das Wachstum von Eukaryoten zu verhindern. Die Evaluierung wurde mit *Fragaria ananassa* (Juli 2002, Botanischer Garten, Universität Bonn) und *Ilex aquifolium* L. durchgeführt (Oktober 2002, Kirschallee 1, Bonn).

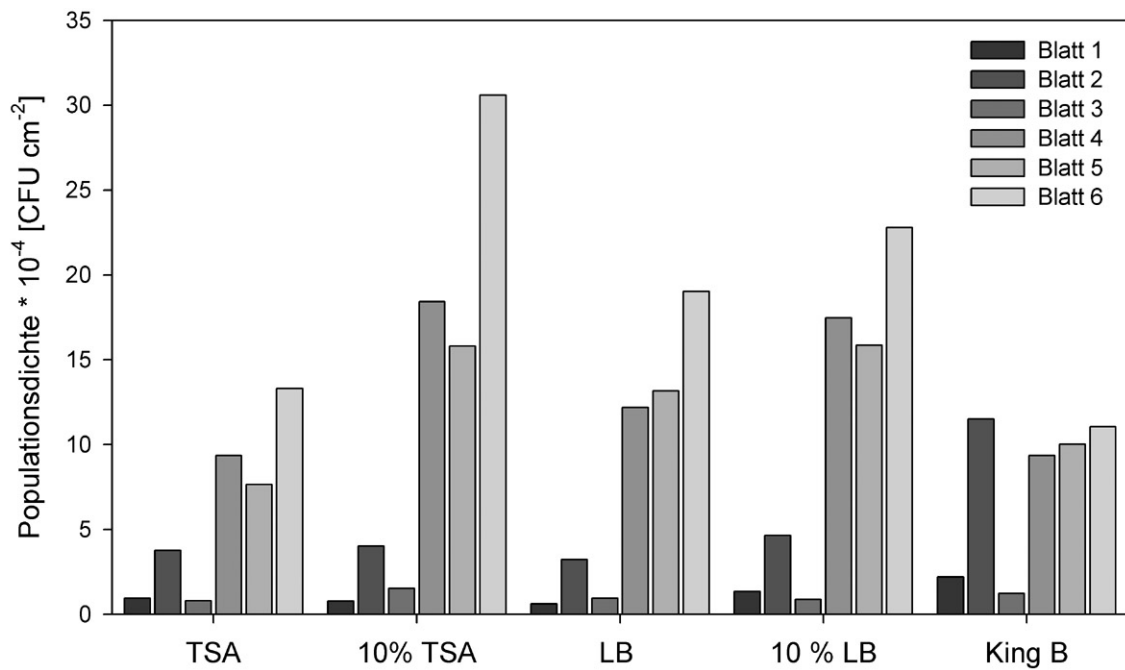


Abbildung 28 Populationsdichten auf 6 verschiedenen Blätter von *Ilex aquifolium* L. nach Kultivierung auf verschiedenen Medien

Wie man in Abbildung 28 sehen kann, schwankte die Populationsdichte je Blatt stark. Für *Fragaria ananassa* ergab sich im Mittel der höchste Wert für TSA, gefolgt von 10 % LB, King B und 10 % TSA (Abbildung 29); der niedrigsten Wert wurde mit LB-Medium erreicht. Auf *Ilex aquifolium* wurden die höchsten Populationsdichten für 10 % TSA ermittelt (Abbildung 29). Aufgrund dieses Ergebnisses und der Beobachtung, dass die Kolonien auf 10 % TSA nicht so groß wurden, kaum ineinander wuchsen und somit gut ausgezählt und vereinzelt werden konnten, wurde in den folgenden Untersuchungen 10 % TSA als Medium verwendet.

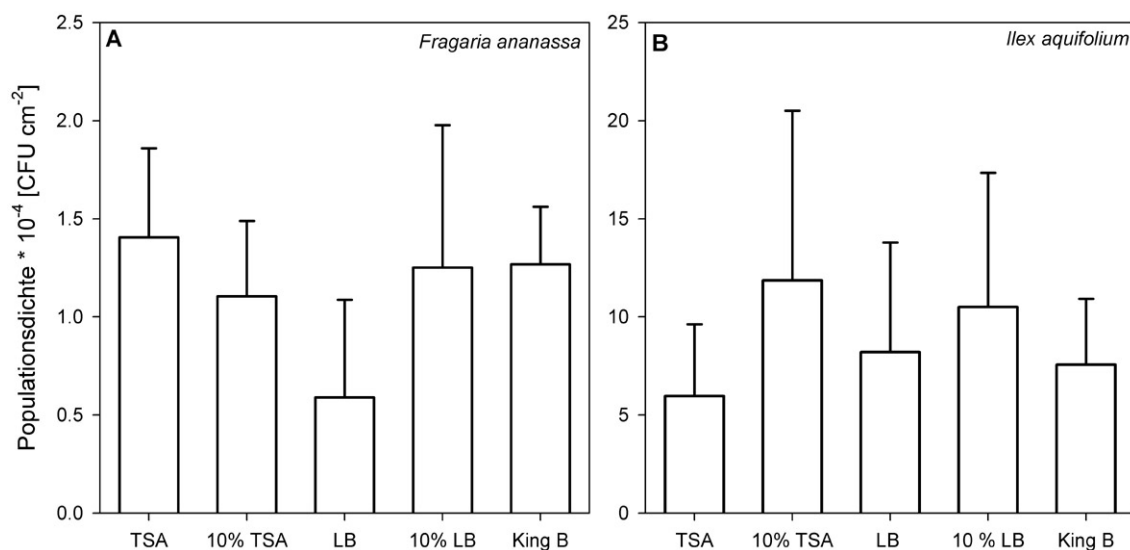


Abbildung 29 Populationsdichten nach Kultivierung auf verschiedenen Medien

A) 3 Blättern von *Fragaria ananassa*; B) 6 Blättern von *Ilex aquifolium* L. Abgebildet sind die Mittelwerte, die Fehlerbalken zeigen das 95 % Konfidenzintervall.

3.1.5 Isolation der Organismen von der Blattoberfläche

Die Mikroorganismen wurden durch Abwaschen von frisch geernteten *Juglans*-Blättern gewonnen. Die Blätter wurden in Phosphatpuffer (Phosphorous Buffered Solution, PBS: 8 g NaCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.2 g KCl, 0.24 g KH₂PO₄ ad 1 l, Sambrook & Russel 2001) gewaschen. Die Blättchen wurden einzeln, sukzessive in ein 50 ml Röhrchen mit 20 ml PBS gegeben und für 60 sek vibrationsgeschüttelt. Diese Waschlösung wurde bei 20 °C und 10000 x g für 30 min in einer Tischkühlzentrifuge (2019R, Napco, USA) abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und verworfen, das Pellet wurde mit PBS auf 5 ml aufgefüllt und gründlich vibrationsgeschüttelt. Von dieser Lösung wurde ein Aliquot entnommen, erneut verdünnt und davon ein Aliquot zur Bestimmung der Kolonien bildenden Einheiten (CFU, Colony Forming Unit) ausplattiert. Als Nährmedium wurden 10 % ige TSA-Platten (Tabelle 2) verwendet. Um das Wachstum von Bakterien bzw. Pilzen zu verhindern, wurden Kanamycin und Ampicillin (je 50 mg l⁻¹) bzw. Actidion (30 mg l⁻¹) hinzugefügt. Die Platten wurden im Kühlbrutschrank (Binder GmbH, Tuttlingen) bei 28 °C für mindestens 48 h bebrütet. Nach 48 h wurden die CFU gezählt; um auch langsam wachsenden Organismen zu erfassen, wurde nach 1 - 2 Tagen erneut nachgezählt.

Für die anschließende Typisierung wurden bei jeder Probennahme repräsentative Kolonien anhand ihrer Koloniefarbe, Form und Textur ausgewählt, und deren Häufigkeit festgehalten. Diese Kolonien wurden auf 10 % TSA-Platten mit Actidion überimpft und bei Bedarf durch einen Drei-Ösen-Ausstrich vereinzelt. Bei erfolgreicher Kultivierung wurden Glycerinstock-Kulturen (10 % TSB:Glycerin:H₂O, 2:1:1) hergestellt und bei -80 °C gelagert.

3.1.6 Bestimmung der Populationsdichte

Die Populationsdichte **PD** [CFU cm⁻²] errechnet sich aus den gezählten Kolonien [CFU], dem Verdünnungsfaktor **F** und der Blattoberfläche **A** [cm²].

$$PD = \frac{CFU * F}{2 * A} \quad \text{Gleichung 10}$$

Zur Bestimmung der Blattfläche wurden die Blätter mit einem Flachbettscanner eingescannt und die Fläche mit Photoshop 6® (Adobe Systems Incorporated, USA) ermittelt.

3.1.7 ARDRA

ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Aalysis), eine Restriktionsanalyse der ribosomalen DNA, ist eine schnelle, kostengünstige Methode um Bakterien unbekannter Art zu identifizieren. Diese Methode wurde 1993 von Vaneechoutte et al. zuerst beschrieben. Bei dieser Methode wird die 16S rDNA mittels Polymerasenkettenreaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction, PCR) amplifiziert und anschließend mit häufig schneidenden Restriktionsenzymen verdaut. Die Restriktionsfragmente werden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und man erhält so für jede Art ein spezifisches Bandenmuster. ARDRA eignet sich sowohl für die Untersuchung einzelner Arten als auch für die Untersuchung komplexer Bakteriengemeinschaften. Leeftang & Smit (1997) nutzten ARDRA, um die bakterielle Artenzusammensetzung im Boden zu charakterisieren. ARDRA fand bisher bereits Anwendung in der Rhizosphären- (McSpadden Gardner & Weller 2001) und Phyllosphärenforschung. Hier gibt es Untersuchungen zur bakteriellen Fluktuation im Gewebe von Ulme (Mocali et al. 2003), der Artenzusammensetzung auf dem Seegrass *Halophila stipulacea* (Weidner et al. 2000) und Stickstofffixierenden Bakterien auf Banane (*Musa* sp.) und Ananas (*Ananas comosus*) (Magalhães Cruz et al. 2001). In diesen Arbeiten wurden verschiedene Restriktionsenzyme eingesetzt. Um nun für die eigenen Untersuchungen geeignete Enzyme zu finden, wurden zuvor 16S rDNA Sequenzen von bekannten Phyllosphären Epiphyten *in silico* mit Hilfe des Computerprogramms Vector NTI (InfoMax, USA) mit den Enzymen aus oben genannten Veröffentlichungen verdaut, um zu sehen, welche eine Aufschlüsselung innerhalb der Familien ermöglichen. Die beste Aufschlüsselung erreichte man durch die Kombination folgender Enzyme *AluI*, *BsuRI*, *RsaI*, *TaqI* (Tabelle 3).

Tabelle 3 Restriktionsenzyme

Enzym	Ursprungsorganismus	Schnittstelle	verwendeter Puffer
<i>AluI</i> *	<i>Arthrobacter luteus</i>	5'.. A G ↓ C T .. 3' 3'.. T C ↑ G A ..5'	Buffer Y+ / Tango™
<i>BsuRI</i> *	<i>Bacillus subtilis</i> R	5'.. T ↓ C G A .. 3' 3'.. A G C ↑ T ..5'	Buffer R+
<i>RsaI</i> *	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>	5'.. G T ↓ A C .. 3' 3'.. C A ↑ T G ..5'	Buffer Y+ / Tango™
<i>TaqI</i> *	<i>Thermus aquaticus</i>	5'.. G G ↓ C C .. 3' 3'.. C C ↑ G G ..5'	Buffer TaqI+

* Alle Enzyme, die für ARDRA eingesetzt wurden, wurden von Fermentas GmbH (St. Leon-Roth) bezogen.

Zur Gewinnung von amplifizierter 16S rDNA wurde die PCR direkt auf der Kolonie durchgeführt. Von den Bakterienstämmen wurde keine DNA isoliert, sondern von einer Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze jeweils eine kleine Menge Bakterien entnommen, welche als Ausgangsmaterial für die PCR dienten. Der PCR-Ansatz sah wie folgt aus: 5 µl 10 x Puffer, 5 µl 25 mM MgCl₂,

1.25 U Taq (alle Sigma-Aldrich GmbH, München), 1 µl 10 mM dNTPs (Fermentas GmbH, St. Leon-Roth), je 10 pmol der Primer SLk8 (5' AGAGTTTGATCATGGCTCAGAT 3') und SRk1506 (5' TACCTTGTTACGACTTCACCCC 3') (MWG Biotech GmbH, Ebersberg) mit H₂O_{deion} auf ein Gesamtvolumen von 49 µl aufgefüllt. Die beiden Primer sind einer Publikation von Schröder et al. (1996) entnommen, jedoch wurde die angehängte Schnittstelle entfernt. Die PCR wurde in Form einer so genannten "touch down"-PCR durchgeführt, dabei wird die Annealing-Temperatur sukzessive erniedrigt. Die PCR wurde entsprechend den Angaben aus Tabelle 4 in einem Primus Thermocycler (MWG Biotech GmbH, Ebersberg) durchgeführt; während der ersten 25 Zyklen wurde die Annealing-Temperatur jeweils um 0.3 °C gesenkt. Um für ARDRA mehr Ausgangsmaterial zu erhalten, wurde auf einen erfolgreichen PCR-Ansatz direkt eine weitere PCR unter den oben genannten Bedingungen mit 1 µl PCR-Produkt als Template durchgeführt.

Tabelle 4 PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	1 min	
Annealing	55 °C, - 0.3 °C	1 min	25
Elongation	74 °C	1.5 min	
Denaturierung	95 °C	1 min	
Annealing	47.5 °C	1 min	13
Elongation	74 °C	1.5 min	
Elongation	74 °C	5 min	

Für den Restriktionsverdau wurden je 10 µl PCR-Produkt mit 5 U Enzym, 2 µl des, in Tabelle 3 aufgeführten, Puffers und 7.5 µl H₂O_{deion} für 2 h bei 37 °C inkubiert (Magalhães Cruz et al. 2001). Die Inaktivierung erfolgte bei 65 °C für 20 min. Die Fragmente wurden auf 2.5 % igen 1 x TAE-Agarosegelen aufgetrennt (Sambrook & Russel 2001). Dem kompletten Ansatz wurden 2 µl 10 x Gelladepuffer (4g Ficoll 400, 200 µg Kresolrot ad 10 ml 50 mM Ehtylendiamintetraacetat (EDTA), Sambrook & Russel 2001) zugesetzt und mindestens 20 µl auf das Gel geladen. Als Größenmarker wurde Ready-Load™100 bp DNA Ladder (Fermentas GmbH, St. Leon-Roth) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 90 V für ca. 6 h. Die Gele wurden nach der Elektrophorese in 200 ml 1 x TAE mit 30 µl Ethidiumbromid (1 % w/v) für 15 min auf einer Wippe (Labortechnik Gröbel GmbH, Lindau) gefärbt und anschließend für 10 min in 300 ml 1 x TAE entfärbt. Die Gele wurden auf einem UV-Leuchttisch (Vilbert Lourmat, Frankreich) mit der Digitalkamera (Powershot G2, Canon Inc., Japan) fotografiert.

Die Gelbilder wurden mit Photoshop® 6.0 (Adobe Systems Incorporated) für die Weiterbearbeitung in LabImage® 2.62a (Kapelan, Labsoft Diagnostics AG, Halle) in ein kleineres Format umgewandelt. LabImage® ist eine Auswertungssoftware, mit der die Fragmentlängen der Restrik-

tionsprodukte ausgemessen werden können. Die Fragmentlängen wurden in 10er Schritten eingeordnet, wobei z.B. 85 – 94 bp, 95 – 104 bp usw. eine Klasse bildeten. Jede Fragmentklasse bildete ein Merkmal, nicht belegte Fragmentklassen wurden nicht berücksichtigt. Aus den Fragmentklassen (Merkmalen) der 4 verschiedenen Enzyme wurde eine Gesamtmatrix erstellt (siehe Abbildung 54).

Zusätzlich wurden die PCR-Produkte, nach einer Aufreinigung mit QiaQuick (Qiagen GmbH, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers, am Lehrstuhl für Botanik I, Universität Würzburg sequenziert. Es wurde nicht die Gesamtlänge sequenziert, sondern mit den Oligonucleotiden Bacteria338 (5' ACTCCGACGGGAGGCAGC 3') und Bacteria1055 (5' CACGAGCTGACGACAGCCAT 3') ein ca. 730 bp großes Teilstück aus der Mitte (Amann et al. 1995).

3.1.8 Stammbaumkonstruktion

Für die Konstruktion der Stammbäume wurde das Programmpaket PHYLIP, Version 3.6 (Felsenstein 1989) verwendet, daraus im Speziellen die Programme RESTDIST, DNADIST, KITSCH, SEQBOOT, CONSENSE, DRAWGRAM und RETREE.

3.1.8.1 Stammbäume aus der Fragmente-Matrix

Aus der Fragmente-Matrix (3.1.7) wurde mit RESTDIST eine Distanzmatrix berechnet. Aus der Distanzmatrix wurde mit KITSCH der Stammbaum berechnet und mit DRAWGRAM gezeichnet. KITSCH verwendet den Fitch-Margoliash-Algorithmus, der von einer evolutionären bzw. molekularen Uhr ausgeht. Der Stammbaum wurde mit RETREE umarrangiert. Die weitere graphische Bearbeitung des Stammbaumes erfolgte mit CorelDRAW 9 (Corel Corporation, USA). Zur besseren Stützung des Stammbaumes und der phylogenetischen Einordnung der Typen, wurden Sequenzen von Phyllosphärenisolaten in den Stammbaum eingearbeitet. Sequenzen bekannter Arten (Tabelle 10) wurden mit SeqMan II (DNASTAR Inc., USA) auf die Länge gebracht, die sich durch die, bei der PCR verwendeten Oligonucleotide ergibt (ca. 1500 bp). Mit MapDraw (DNASTAR Inc., USA) wurden diese Sequenzen *in silico* mit den Enzymen *AluI*, *BsuRI*, *RsaI* und *TaqI* verdaut. Aus den Positionen der Schnittstellen wurden die Fragmentlängen berechnet und zusammen mit den reellen Fragmenten aus dieser Arbeit in eine Fragmente-Matrix umgewandelt. Zugunsten der Übersichtlichkeit wurde der Stammbaum aufgeteilt; die γ -Proteobacteria wurden getrennt von allen anderen bearbeitet. Die Stammbaumkonstruktion erfolgte wie oben beschrieben.

3.1.8.2 Stammbaum aus Sequenzen

Da die Qualität und Länge der Sequenzen nicht sehr hoch war, wurde mit SeqMan II (DNASTAR Inc., USA) eine ca. 230 bp lange Sequenz (*E. coli*-Positionen 804 – 1031) aus der Bacteria1055-Sequenz ausgeschnitten und mit ClustalW, Version 1.7 (Thompson et al. 1994) aligniert. Um zur Stammbaumberechnung den gleichen Algorithmus wie für die Fragmente-Matrix verwenden zu können, wurde das Alignment mit dem Programm DNADIST in eine Distanzmatrix umgerechnet. Aus dieser wurde mit KITSCH der Stammbaum berechnet, der mit DRAWGRAM gezeichnet wurde. Der Stammbaum wurde mit RETREE umarrangiert. Die graphische Bearbeitung des Stammbaumes erfolgte mit CorelDRAW 9 (Corel Corporation, USA). Für die Bootstrap-Analyse wurde mit SEQBOOT ein 100facher Datensatz erzeugt, aus dem wie oben beschrieben mit DNADIST und KITSCH Stammbäume berechnet wurden. Mit CONSENSE wurden der Consensus-Baum und die Bootstrapwerte berechnet.

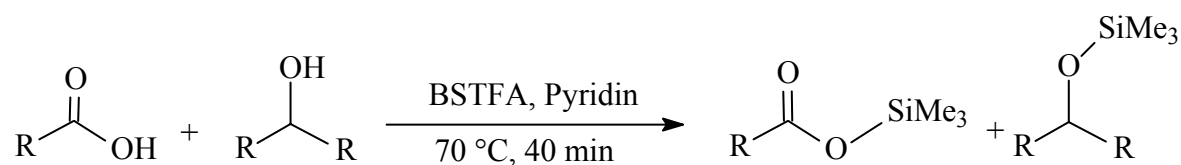
3.1.9 Transpirationsmessung an *Juglans regia* Blattscheiben

Versuchsandordnung wie in Abbildung 3 und Abbildung 4 auf Seite 8.

Die Messungen wurden mit Blättern vom 12.5., 13.6., 22.7., 24.9. und 24.10.2003 vorgenommen. Aus zehn verschiedenen, augenscheinlich gesunden Blättern wurde jeweils eine Scheibe mit einem Korkbohrer (Durchmesser = 2 cm) ausgestanzt. Die Blattscheiben wurden in Transpirationskammern eingebaut, in die zuvor 800 µl Donorlösung eingefüllt worden war. Die Blattunterseite zeigte zum Donor-Kompartiment. Als Donorlösung diente Tritium-markierter Phosphorpuffer (PBS: 8 g NaCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.2 g KCl, 0.24 g KH₂PO₄ ad 1 l (Sambrook & Russel 2001)) mit einer Aktivität von $3,5 - 6 \cdot 10^6$ DPM ml⁻¹ (spezifische Aktivität: 925 MBq g⁻¹, Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig). Die Transpirationskammern wurden zum Abdichten mit Hochvakuumsilikonfett (Wacker Chemie GmbH, München) gefettet, auf Szintillationsgefäße gestellt und bei 25 °C im Dunklen in einem Kühlbrutschrank (Binder GmbH, Tuttlingen) inkubiert. Die Szintillationsgefäße wurden zuvor mit 1 ml H₂O_{deion.} befüllt und bei 25 °C äquilibriert. Nach einer Äquilibrationsphase von mind. 12 h wurden die Gefäße mit Receiver in regelmäßigen Abständen ausgetauscht, die Lösung mit 2 ml Szintillations-Cocktail Ultima Gold XR (Canberra Packard GmbH, Österreich) versetzt und im Flüssigszintillationszähler (TriCarb® 1600 CA, Canberra Packard GmbH, Österreich) gemessen.

3.1.10 Wachsanalytik (GC/FID und GC/MS)

Die Blätter wurden nach dem Ernten so bald wie möglich weiterbearbeitet, falls dies nicht möglich war, wurden sie bei 4 °C gelagert. Für die Wachsextraktion wurden die Blätter jeweils 30 s in 400 ml Chloroform getaucht. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Blätter unverletzt waren und die Blattansatzstellen nicht mit dem Chloroform in Berührung kamen, um eine Extraktion von Blattinhaltsstoffen zu vermeiden. Zur Bestimmung der Blattoberfläche wurden die nicht eingetauchten Stellen abgeschnitten und die Blätter mit einem Flachbettscanner eingescannt. Die Blattflächen wurden mit Photoshop 6® (Adobe Systems Incorporated, USA) bestimmt. Die Gesamtblattoberfläche entspricht der zweifachen Blattfläche. Der Chloroformextrakt wurde mit einem Rotationsverdampfer (Büchi Labortechnik AG, Schweiz) bei 40 °C und 400 mbar auf ein Volumen von 1 - 5 ml eingengt. Dem Extrakt wurde ein Aliquot einer Standard-Lösung (C₂₄-Alkan, Tetracosan) zugesetzt. Die notwendige Menge, sie sollte etwa einem Zehntel des Gesamtwachses entsprechen, wurde anhand der Blattfläche und Literaturangaben bei Knoll & Schreiber (1998) abgeschätzt. Die Analyse der Substanzen im Blattwachs erfolgte mittels Gaschromatographie. Um die Flüchtigkeit und Trennbarkeit der gelösten Substanzen zu erhöhen, und ihre Reaktivität mit der Säulenbeschichtung zu verringern, wurde die getrocknete Probe (70 °C, unter Stickstoffstrom) in 20 µl wasserfreiem Pyridin (Merck KGaA, Darmstadt) aufgenommen und mit 20 µl BSTFA (N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) trimethylsilyliert. Diese Derivatisierungsreaktion wurde in einem mit Schraubdeckel und Teflondichtung verschlossenen Reaktionsgefäß bei 70 °C für 40 min durchgeführt, dabei wird an die freien Hydroxy- und Carboxyfunktionen eine Trimethylsilylgruppe angehängt (Gleichung 11).



Gleichung 11

Vor der weiteren Verwendung wurde die Reaktionslösung mit 200 µl CHCl₃ verdünnt. Je 1 µl der verdünnten, trimethylsilylierten Proben wurde zur gaschromatographischen Trennung direkt auf die Kapillarsäule (DB-1, Fused-Silica, Länge 30 m, Innendurchmesser 0.32 mm Filmschichtdicke 0.10 µm aus 100 % Polymethylsiloxan, J&W Scientific, USA) eines temperatur- und druckgesteuerten Gaschromatographen (GC) (6890N Agilent Technologies, USA) gegeben (*on column*-Injektion mittels Autosampler). Das Temperaturprogramm der GC/FID und GC/MS-Analysen ist in Tabelle 5 aufgeführt. Die Analysen erfolgten bei einem konstanten Gasfluss von 2 ml min⁻¹. Die

quantitative Analyse der getrennten Substanzen erfolgte durch einen Flammenionisationsdetektor (FID); als Trägergas diente Wasserstoff. Die Daten wurden mit der Software HP GC ChemStation (Rev. A.07.01 [682]) ausgewertet. Aus den Flächen der Einzelsubstanzsignale berechnet sich die Masse der Substanz in Relation zur Fläche des internen Standardsignales; bezogen auf die Gesamtblattoberfläche des Blattwachsextraktes lässt sich die Wachsbelegung für die jeweilige Substanz berechnen (Gleichung 12).

$$m_S = \frac{A_S * m_{Std}}{A_{Std} * A_B} \quad \text{Gleichung 12}$$

A_{Std} = Fläche des Standardsignales im Gaschromatogramm

A_S = Fläche des Substanzsignales im Gaschromatogramm

A_B = Blattoberfläche [cm^2]

m_{Std} = zugegebene Masse der Standardsubstanz [μg]

m_S = Masse der Substanz pro Bezugsgröße [$\mu\text{g cm}^{-2}$]

Zur qualitativen Analyse wurde ein GC mit angeschlossenem Quadrupol-Massenspektrometer (GC6900N, MS 5973 Agilent Technologies, USA) verwendet. 1 μl der derivatisierten Proben wurde über eine DB 1 MS Kapillarsäule (30 m, Innendurchmesser 0.32 mm, 0.10 μm Beschichtung mit 100 % Polymethylsiloxan, J&W Scientific, USA) aufgetrennt; als Trägergas diente Helium. Die Auswertung der Massenspektren erfolgte mit dem Auswertungsprogramm Enhanced ChemStation G1701 AA (Version A.03.00, Hewlett Packard) anhand der Zerfallsmuster oder dem Vergleich mit Spektren authentischer Substanz-Proben.

Tabelle 5 Temperaturprogramm der GC/FID und GC/MS Analysen

Temperatur	Gradient	Dauer
50 °C	- -	2 Min
bis 200 °C	40 °C Min^{-1}	Maximum 2 Min halten
bis 310 °C	2 °C Min^{-1}	Maximum 30 Min halten

Die Gesamtwachsmenge wurde nach der gaschromatographischen Analyse aus der Gesamtfläche aller Signale nach Abzug der Signale berechnet, die als Zucker identifiziert wurden.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Besiedlungsverlauf

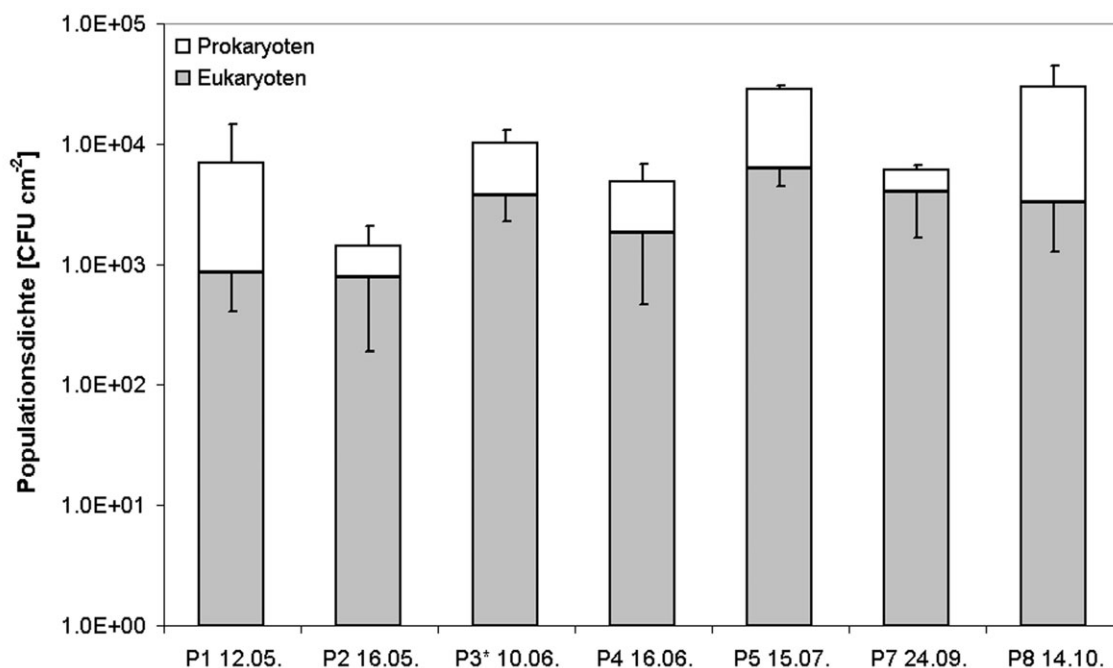


Abbildung 30 Populationsdichten im Verlauf der Vegetationsperiode

Gezeigt sind die Mittelwerte von je 3 Blättern (mit Ausnahme von P3, da wurden nur 2 Blätter berücksichtigt); die Fehlerbalken zeigen das 95 % Konfidenzintervall.

Die Populationsdichte auf *Juglans regia* L. ist starken Schwankungen unterworfen. Die geringste Gesamtbesiedlung findet sich im Mai (P2) mit $1.420 \cdot 10^3$ CFU cm⁻²; die größte Populationsdichte im Oktober (P8) mit $3.014 \cdot 10^4$ CFU cm⁻² (Abbildung 30, Tabelle 6). Die Anzahl der bakteriellen Isolate hingegen schwankte stark und änderte sich innerhalb weniger Tage drastisch (z.B. P1 und P2). Die großen Vertrauensbereiche entstanden dadurch, dass die Populationsdichte auf den drei untersuchten Blättern sehr unterschiedlich sein kann (Abbildung 28). Dies war der Fall bei P3; von einem der untersuchten Blätter wurden 25 000mal mehr Bakterien isoliert als von den beiden anderen zusammen (Tabelle 6). Die Anzahl der eukaryotischen Isolate war während der Vegetationsperiode ebenfalls Schwankungen unterworfen, jedoch nicht in so großem Umfang wie die prokaryotischen Isolate.

Tabelle 6 Mittlere Populationsdichte auf *Juglans regia* L. zu verschiedenen Zeitpunkten
 Die Zahlen in Klammern geben das 95 % Konfidenzintervall an.

Probe	Datum	Bakterien	Pilze	Gesamt
P1	12.05.2003	$6.081 * 10^3$ ($\pm 7.555 * 10^3$)	$8.435 * 10^2$ ($\pm 4.364 * 10^2$)	$6.924 * 10^3$ ($\pm 7.868 * 10^3$)
P2	16.05.2003	$6.452 * 10^2$ ($\pm 6.584 * 10^2$)	$7.752 * 10^2$ ($\pm 5.854 * 10^2$)	$1.420 * 10^3$ ($\pm 1.244 * 10^3$)
P3	10.06.2003	$5.466 * 10^7$ ($\pm 7.137 * 10^7$)	$6.007 * 10^3$ ($\pm 3.126 * 10^3$)	$5.466 * 10^7$ ($\pm 7.137 * 10^7$)
P3*	10.06.2003	$6.601 * 10^3$ ($\pm 2.846 * 10^3$)	$3.684 * 10^3$ ($\pm 1.415 * 10^3$)	$1.029 * 10^4$ ($\pm 4.261 * 10^3$)
P4	16.06.2003	$3.057 * 10^3$ ($\pm 1.999 * 10^3$)	$1.814 * 10^3$ ($\pm 1.349 * 10^3$)	$4.871 * 10^3$ ($\pm 3.335 * 10^3$)
P5	15.07.2003	$2.249 * 10^4$ ($\pm 1.534 * 10^3$)	$6.239 * 10^3$ ($\pm 1.837 * 10^3$)	$2.873 * 10^4$ ($\pm 3.189 * 10^3$)
P7	24.09.2003	$2.084 * 10^3$ ($\pm 5.859 * 10^2$)	$3.977 * 10^3$ ($\pm 2.328 * 10^3$)	$6.061 * 10^3$ ($\pm 2.304 * 10^3$)
P8	14.10.2003	$2.686 * 10^4$ ($\pm 1.444 * 10^4$)	$3.275 * 10^3$ ($\pm 2.014 * 10^3$)	$3.014 * 10^4$ ($\pm 1.620 * 10^4$)

* P3 ohne Blatt 2.

3.2.2 Typisierung und Identifikation der bakteriellen Epiphyten mittels ARDRA

3.2.2.1 Auswahl der Stämme für ARDRA

Nach jeder Probennahme wurden zwischen 15 und 30 charakteristische Stämme für die Typisierung ausgewählt (siehe Tabelle 7). Der prozentuale Anteil der typisierten Stämme an der Gesamtbakterienzahl wurde ausgehend von der Verteilung der unterschiedlichen Stämme und der Gesamtbakterienzahl bezogen auf die Gesamtblattoberfläche [CFU cm^{-2}] je Probennahme berechnet. Die Typisierung erfolgte von der Originalkultur ausgehend. Die Stämme, die bei jeder Probennahme zur Typisierung ausgewählt wurden, sind im Anhang dargestellt (Kapitel 7.1.2, Seite III).

Tabelle 7 Übersicht über die Probennahmen

Probenkürzel, Anzahl der selektierten Stämme zu jedem Sammelzeitpunkt, Identifikationsquote und Anteil an der Gesamtbakterienzahl zum jeweiligen Zeitpunkt.

Probennahme	P1	P2	P3	P4	P5	P7
Sammelzeitpunkt	12. 5.	16. 5	10. 6.	16. 6.	15. 7.	24. 9.
ausgewählte Stämme	21	30	30	15	27	20
PCR erfolgreich [%]	61.90	90.00	83.33	60.00	37.04	55.00
Anteil an Gesamtbakterien [%]	54.93	93.16	89.35	65.05	37.65	38.96

3.2.2.2 Restriktionsanalyse

Von den 143 zur Identifikation ausgewählten Stämmen konnten nach erfolgreicher PCR 66.43 % der Restriktionsanalyse unterzogen werden, dies entsprach ohne Berücksichtigung von Blatt 2 bei P3 einem Anteil von 48.85 % an den insgesamt ausgezählten CFU. Die Verteilung innerhalb der einzelnen Probennahmen ist in Tabelle 7 aufgeführt.

PCR-Produkte mit ausreichend starken Banden wurden wie unter 3.1.7 beschrieben mit den Enzymen *AluI*, *BsuRI*, *RsaI* und *TaqI* verdaut. Die Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt; die Gelanalyse erfolgte mit LabImage® Version 2.62a (Abbildung 31).

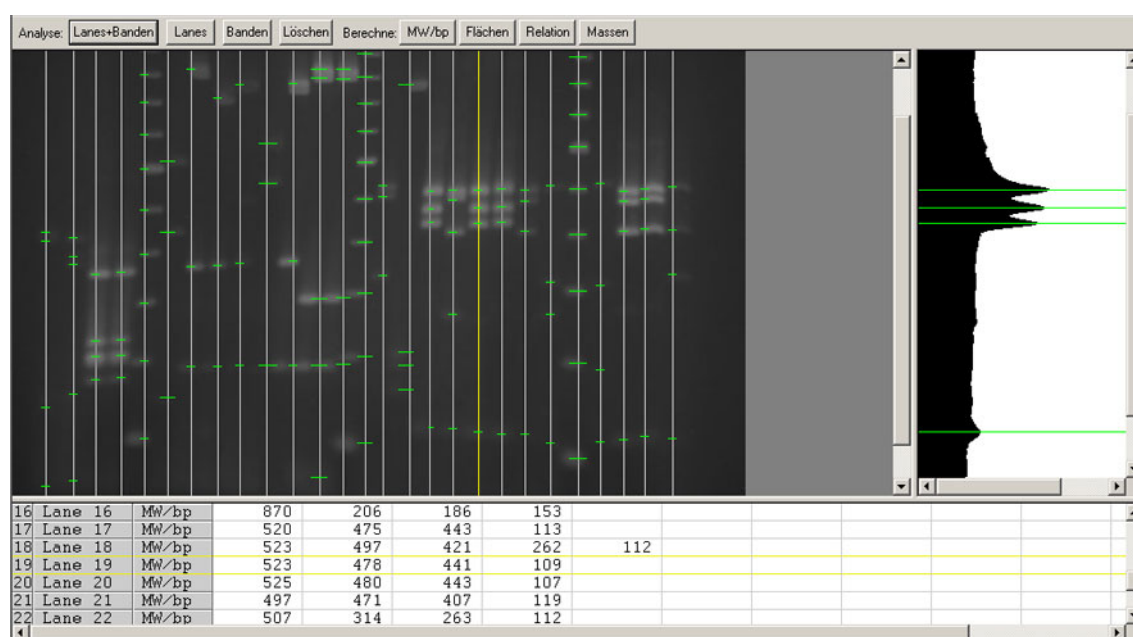


Abbildung 31 Gelanalyse mit LabImage®

Gezeigt ist ein Verdau mit verschiedenen Enzymen. Größenmarker (100 bp Plus, Fermentas GmbH, St. Leon-Roth) befindet sich in den Spuren 5, 14 und 23. Das Programm berechnet die Fragmentlänge über die bekannten Bandengrößen des Markers.

Die Gelanalysen resultierten in 17 - 19 verschiedene Fragmentmuster für die vier Enzyme, diese sind im Anhang in Tabelle 11 - Tabelle 14 aufgelistet; Fragmente kleiner als 90 bp wurden nicht berücksichtigt. Insgesamt ergaben sich 36 verschiedene Fragmentmuster-Kombinationen, diese bilden die Basis für die Klassifizierung der 36 Typen. Aus der Kombination der Fragmente der vier Enzyme wurde eine Fragmente-Matrix erstellt (Anhang, Abbildung 54); diese diente als Ausgangsmatrix für die Berechnung einer Distanzmatrix, aus der anschließend, wie in Kapitel 3.1.8.1 beschrieben, der Stammbaum (Abbildung 32) berechnet wurde. Im Anhang befindet sich eine ausführliche Beschreibung der 36 Typen, die mit ARDRA typisiert wurde (Kapitel 7.1.3, Seite VI ff)

Aus der Fragmente-Matrix wurde mit RESTDIST (Felsenstein, 1989) die genetische Distanz der Fragmentmuster berechnet. RESTDIST verwendet eine Modifikation des, von Nei und Li entwickelten Algorithmus. Aus der resultierenden Distanzmatrix wurde mit KITSCH unter Verwendung des Fitch-Margoliash-Algorithmus und der Annahme einer evolutionären (molekularen) Uhr ein Stammbaum berechnet (Abbildung 32). Aus dem Stammbaum lässt sich erkennen, dass einige Typen Cluster bilden (z. B. [10 - 11, 15 - 17, 25 - 26], [1 - 2, 7], [3 - 6, 8 - 9, 23], [29 - 33]), andere wiederum sich nicht zuordnen lassen (z. B. 12, 19, 24, 27,36).

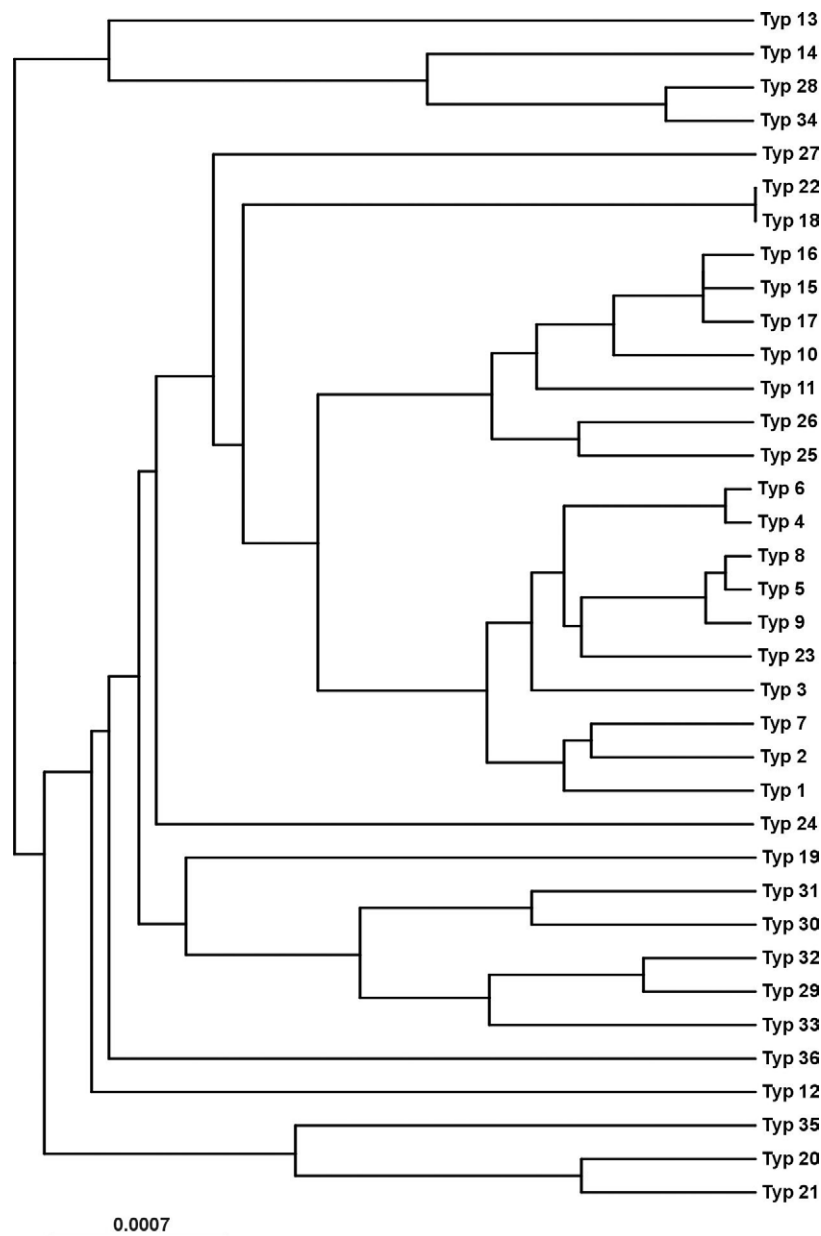


Abbildung 32 Stammbaum aus der Fragmente-Matrix

Der Maßstab gibt die Substitutionen pro Merkmal an; ein Merkmal ist das Vorhanden- oder Nicht-Vorhandensein eines Fragmentes.

3.2.2.3 Stammbaumanalyse

Da der Stammbaum (Abbildung 32) so wenig informativ ist, wurden zum Vergleich bekannte Phyllosphärenisolate (Tabelle 10, Seite 86 ff) in die Fragmente-Matrix aufgenommen und daraus ein Stammbaum erstellt. Da dieser sehr groß und unübersichtlich war, wurden die γ -Proteobacteriaceae herausgenommen, und für diese ein eigener Stammbaum berechnet (Abbildung 33). Die übrigen Arten sind in Abbildung 34 zu sehen. So konnten die Isolate dieser Arbeit Familien zugeordnet werden. Mit Ausnahme von Typ 13, 14, 20, 21, 28, 34 und 35 konnten alle Typen phylogenetisch zugeordnet werden. Eine ausführliche Beschreibung befindet sich im Anhang, Kapitel 7.1.3, Seite VI ff.

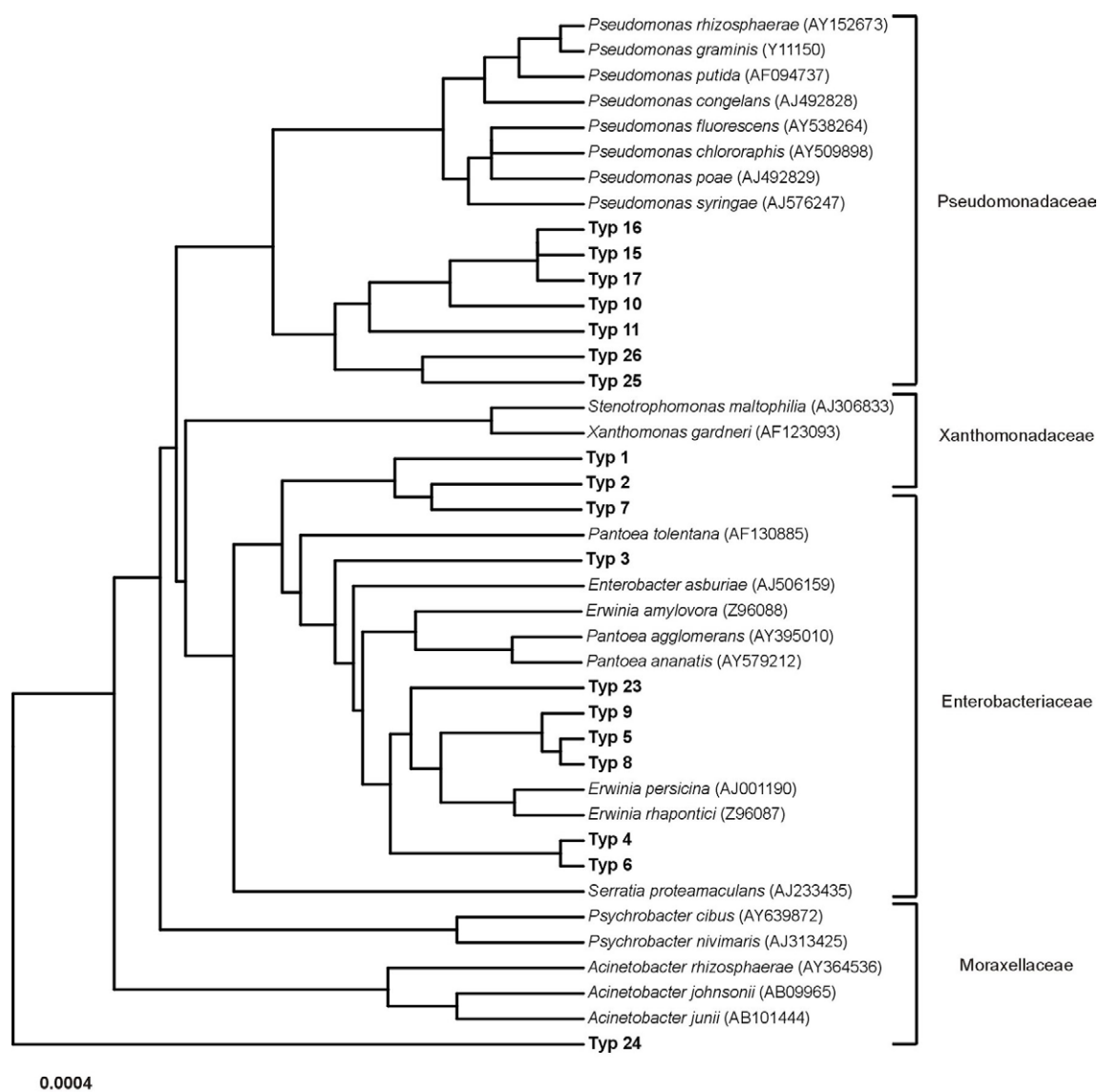


Abbildung 33 Stammbaum der γ -Proteobacteria

Der Stammbaum wurde aus den ARDRA-Fragmentmustern der 16S rDNA der Arten berechnet. Der Maßstab zeigt die Substitutionen pro Merkmal an. Ein Merkmal ist das Vorhanden oder Nicht-Vorhandensein eines Fragmentes. Die NCBI-Akzessionsnummer der Sequenzen ist in Klammern angegeben.

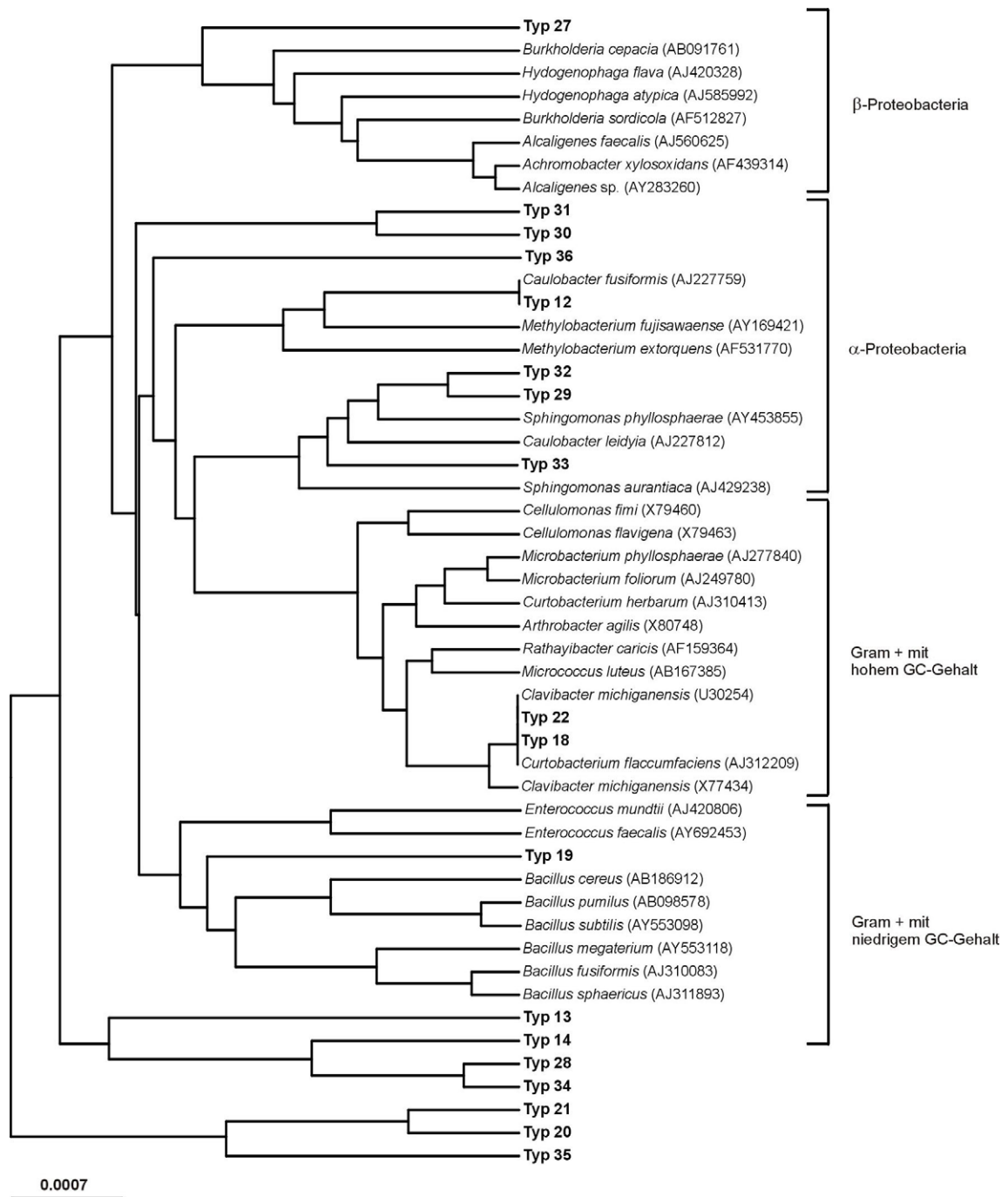


Abbildung 34 Stammbaum aller Arten ohne γ -Proteobacteria

Der Stammbaum wurde aus den ARDRA-Fragmentmustern der 16S rDNA der Arten berechnet. Der Maßstab zeigt die Substitutionen pro Merkmal an. Ein Merkmal ist das Vorhanden oder Nicht-Vorhandensein eines Fragmentes. Die NCBI-Akzessionsnummer der Sequenzen ist in Klammern angegeben.

3.2.2.4 Sequenzanalyse

Um die Ergebnisse der Stammbaumanalyse zu verifizieren, wurde ein Teil der 16S rDNA sequenziert (siehe Kapitel 3.2.2.4). Für die Typen 1, 12, 18 – 22, 25, 28 und 35 konnten keine Sequenzen erhalten werden; für die restlichen Typen konnten nur zum Teil ausreichend lange Sequenzen für ein Alignment produziert werden (Tabelle 8). Die Analyse der Sequenzen erfolgte über das Internet mit BLAST (Altschul et al. 1997), mit dem Alignment der beiden Teilsequenzen (Bac338 und Bac1055, Tabelle 8); falls dieses nicht berechnet werden konnte, dann mit den Teilsequenzen. Die Ergebnisse der BLAST-Suche stützen die Resultate der Stammbaumanalysen.

Aus einem ca. 230 bp großen Stück der 16S rDNA wurde mit einem Teil der Sequenzen ein Stammbaum berechnet (3.1.8.2) und eine Bootstrap-Analyse durchgeführt (Abbildung 35). Die phylogenetische Zuordnung erfolgte auf Grundlage der BLAST-Ergebnisse (Tabelle 8). Die Werte der Bootstrap-Analyse sind zum Teil relativ niedrig, allerdings werden die Cluster, die bereits im Fragmente-Stammbaum (Abbildung 32) erkennbar sind, gut gestützt (100 für das Pseudomonadaeen- und Enterobacteriaceen-Cluster). Insgesamt lässt sich eine große Übereinstimmung zum Fragmente-Stammbaum (Abbildung 32) und den Stammbäumen mit bekannten Isolaten (Abbildung 33, Abbildung 34) erkennen.

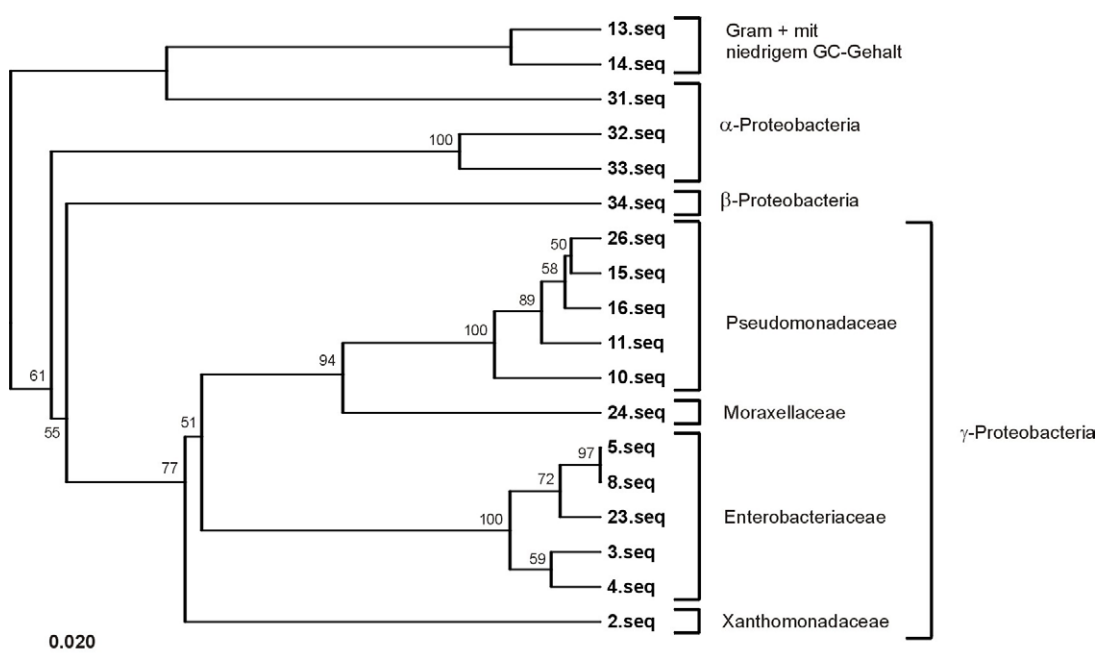


Abbildung 35 Stammbaum aus Sequenzen

Der Maßstab gibt die Substitutionen pro Base an. Die Bootstrapwerte stehen neben den Verzweigungen (100 Wiederholungen); Werte unter 50 sind nicht gezeigt.

Die Sequenzen wurden mit BLAST (Altschul et al. 1997) in der Internetdatenbank des National Center for Biotechnology Information, NCBI mit Sequenzen aus Datenbanken verglichen. Die Sequenzen zeigten zum Teil sehr hohe Übereinstimmungen mit bekannten Sequenzen aus dem Internet (Tabelle 8). Dabei sei zu berücksichtigen, dass es sich häufig um sehr kurze Teilsequenzen handelt (z. B. Typ 7). Einzelne Bereiche innerhalb der 16S rDNA besitzen einen unterschiedlich hohen Konservierungsgrad. Innerhalb des sequenzierten Abschnittes ist die Verteilung jedoch ähnlich der der Gesamtlänge (53 % > 95 % Konservierung, 14 % 80 – 90 % Konservierung, 30 % < 80 % Konservierung, 3 % Positionen variabler Länge).

Tabelle 8 BLAST-Ergebnisse

Gezeigt sind die Längen der Teilsequenzen (für die Primer Bacteria338 und Bacteria1055), die Länge des Alignment (A), der beste Treffer aus der NCBI-Datenbank incl. NCBI-Akzessionsnummer und die Übereinstimmung mit der Sequenz in Prozent. Bei mehrfacher Übereinstimmung ist nur der erste Treffer aufgeführt.

Typ	Bac 338	Bac 1055	A	bestere Treffer	Übereinstimmung in %	NCBI Nummer
2	-	600	-	<i>Xanthomonas gardneri</i> strain CNPH49	99.47	AY288083
3	-	558	-	<i>Pantoea agglomerans</i> strain GSPB 450	99.82	AF373197
4	-	709	-	<i>Enterobacter agglomerans</i> strain A84	99.86	AF130948
5	-	739	-	<i>Erwinia billingiae</i>	98.63	Y13249
6	724	597	591	<i>Enterobacter agglomerans</i> strain A84	99.32	AF130948
7	88	218*	-	<i>Erwinia persicinus</i>	100	Z96086
8	428	680	691	<i>Erwinia billingiae</i>	98.25	Y13249
9	291	-	-	<i>Enterobacter asburiae</i>	99.31	AJ318908
10	358	481	659	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atropurpurea</i>	98.73	AB001440
11	323	679	697	<i>Pseudomonas</i> sp. K94.23	99.84	AY456705
13	358	473	676	<i>Bacillus fusiformis</i>	99.70	AY472114
14	275	532*	-	<i>Bacillus pumilus</i>	99.43	AY112667
15	110	432*	-	<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	98.37	AY152673
16		398		<i>Pseudomonas</i> sp. Fa4	99.21	AY131223
17	198	281*		<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	96.51	AY152673
23	234	266*	-	<i>Erwinia persicinus</i>	99.56	Z96086
24	235	434*	-	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	100	AB099655
26	237	423*	-	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>erobotryae</i>	99.52	AB001442
27	-	193	-	β-Proteobacterium HJ12	97.31	AY237409
29	102	154*	-	<i>Afipia</i> sp. T2-20	97.89	AY278887
30	266	-	-	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	96.62	AJ626984
31	281	600	644	<i>Methylobacterium</i> sp. BF15	99.69	Z23160
32	243	844	659	<i>Caulobacter leidyia</i>	98.29	AJ227812
33	265	410*	-	<i>Sphingomonas</i> sp. M3C203B-B	99.50	AF395031
34	151	730	693	<i>Burkholderia</i> sp. CD9	98.41	AY178076
36	235	-	-	drinking water bacterium MB8	96.89	AY328840

* Sequenz, mit der geblastet wurde.

3.2.2.5 Verteilung der Typen während der Vegetationsperiode

Die Beschreibung bezieht sich auf Abbildung 36, in der die Populationsgrößen der einzelnen Arten auf die Blattfläche bezogen sind; im Text wurden die absoluten Zahlen verwendet. In Tabelle 16 befindet sich eine Auflistung der Daten.

Bei P1 wurden 6 Typen aus der Gruppe γ -Proteobacteria (4 Enterobacteriaceae, 2 Xanthomonadaceae) und ein Gram-positiver Typ mit niedrigem GC-Gehalt isoliert. Am häufigsten war Typ 1 mit $2.404 \cdot 10^6$ CFU, einem Anteil von 32 % an der Gesamtpopulation, gefolgt von Typ 2, 3 und 4 mit je $4.804 \cdot 10^6$ CFU (6.41 %).

Bei P2 wurden 6 Typen aus der Gruppe γ -Proteobacteria (5 Enterobacteriaceae, 1 Xanthomonadaceae), ein Typ α -Proteobacteria und ein Gram-positiver Typ mit niedrigem GC-Gehalt gefunden. Am häufigsten war Typ 8 mit $7.182 \cdot 10^5$ CFU, einem Anteil von 51.06 % an der Gesamtpopulation, gefolgt von Typ 4 mit $1.763 \cdot 10^5$ CFU (12.53 %) und Typ 13 mit $1.330 \cdot 10^5$ CFU (9.45 %).

Bei P3 wurden 9 Typen aus der Gruppe γ -Proteobacteria (4 Pseudomonadaceae, 3 Enterobacteriaceae, 1 Xanthomonadaceae, 1 Moraxellaceae) gefunden, ein Typ α -Proteobacteria und ein Typ, der nicht zugeordnet werden konnte. Am häufigsten war Typ 25 mit $1.300 \cdot 10^{11}$ CFU, einem Anteil von 84.52 % an der Gesamtpopulation, gefolgt von Typ 24 mit $1.033 \cdot 10^{10}$ CFU (6.720 %) und Typ 4 mit $5.167 \cdot 10^9$ CFU (3.360 %). Diese hohen Besiedlungszahlen beruhen hauptsächlich auf Blatt 2. Die nahe Verwandtschaft von Typ 25 mit Typ 26, welches anhand der Sequenz als *Pseudomonas syringae* pv. *eriobotryae* identifiziert wurde, lässt den Rückschluss zu, dass es sich bei Typ 25 ebenfalls um ein Pathogen handeln könnte. Dafür spricht auch die hohe Anzahl an CFU einer Art. Vermutlich war das Blatt noch symptomfrei, sonst wäre es nicht ausgewählt worden. Lässt man nun Blatt 2 bei den Berechnungen heraus, so ergibt sich ein anderes Bild. Häufigster Typ ist Typ 8 mit $2.979 \cdot 10^6$ CFU (35.85 %), gefolgt von Typ 1 mit $1.505 \cdot 10^6$ CFU (18.11 %) und Typ 26 mit $9.760 \cdot 10^5$ CFU (11.74 %).

Bei P4 wurden 4 Typen aus der Gruppe γ -Proteobacteria (2 Enterobacteriaceae, 1 Xanthomonadaceae, 1 Pseudomonadaceae) und 2 Gram-Positive isoliert. Am häufigsten war Typ 4 mit $6.071 \cdot 10^5$ CFU, einem Anteil von 26.45 % an der Gesamtpopulation, gefolgt von Typ 18 mit $2.744 \cdot 10^5$ CFU (11.96 %) und Typ 7 mit $2.245 \cdot 10^5$ CFU (9.78 %).

Bei P5 wurden 5 Typen aus der Gruppe α -Proteobacteria und 2 nicht zugeordnete Typen isoliert. Am häufigsten war Typ 28 mit $8.100 \cdot 10^6$ CFU, einem Anteil von 20.25 % an der Gesamtpopulation, gefolgt von Typ 36 mit $6.486 \cdot 10^6$ CFU (16.21 %) und Typ 31 mit $1.434 \cdot 10^5$ CFU (0.36 %).

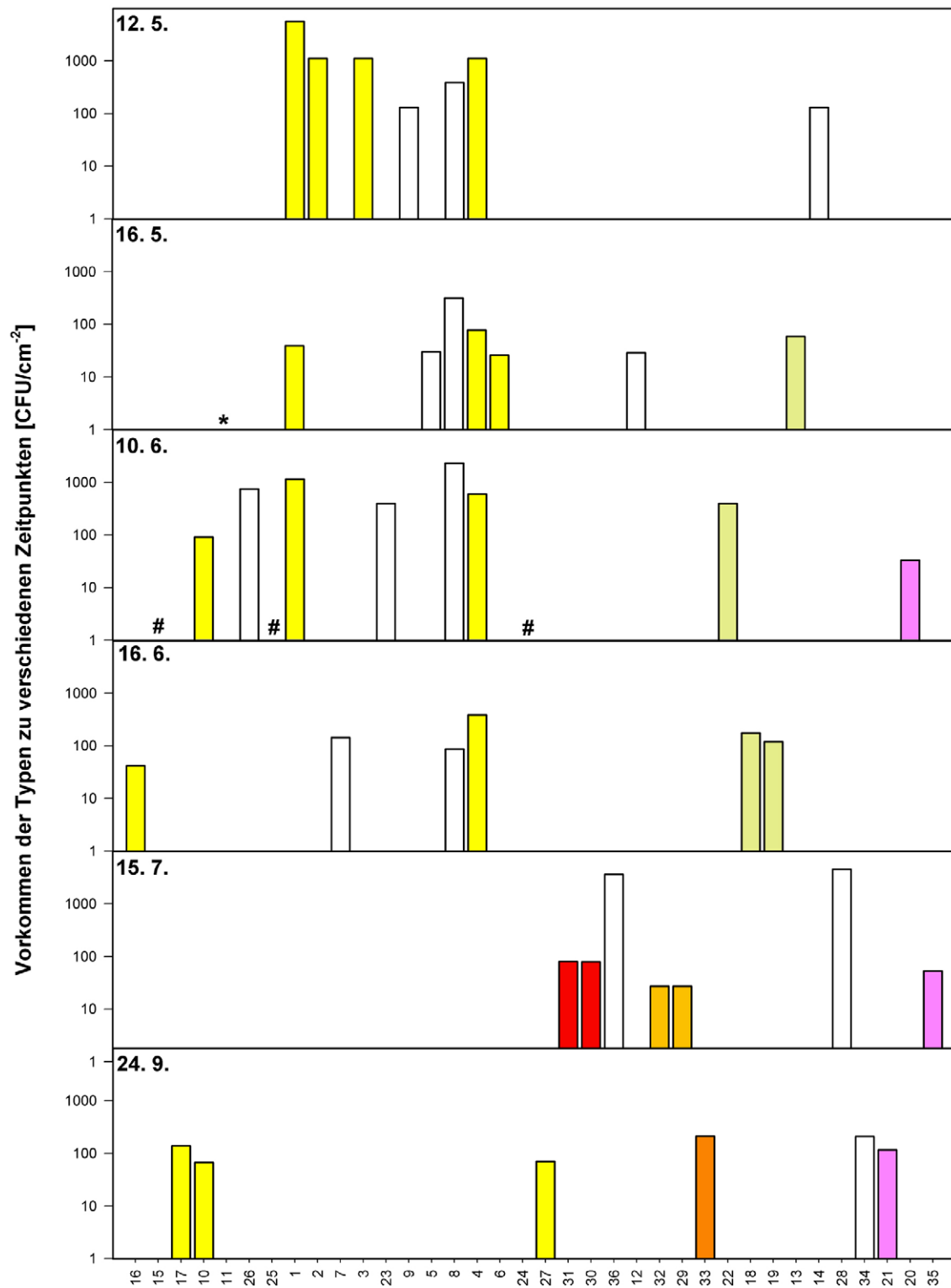


Abbildung 36 Typenverteilung während der Vegetationsperiode

Das Vorkommen der Typen [CFU cm⁻²] wurde anhand der Populationsdichten und der Häufigkeit berechnet. Die Typen sind in der Reihenfolge angeordnet, die sich aus den Clustern der Stammbäume (Abbildung 34 und Abbildung 33) ergibt. Von links nach rechts: 16 – 24 γ -Proteobacteria; mit 16 – 25 Pseudomonadaceae, 1 – 2 Xanthomonadaceae, 7 – 6 Enterobacteriaceae, 24 Moraxellaceae; 27 β -Proteobacteria; 31 – 33 α -Proteobacteria; 22 – 18 Gram positive mit hohem GC-Gehalt; 19 – 14 Gram negative mit niedrigem GC-Gehalt; die restlichen Typen konnten nicht näher charakterisiert werden. Siehe auch Tabelle 8. * Das Vorkommen betrug 0.47 CFU cm⁻². # Die Typen 15, 24 und 25 kamen ausschließlich auf Blatt 2 vor, welches hier nicht berücksichtigt wurde.

Bei P7 wurden 2 Typen aus der Gruppe γ -Proteobacteria (nur Pseudomonadaceae), je 1 Typ α - bzw. β -Proteobacteria und 2 nicht zugeordnete Typen isoliert. Am häufigsten war Typ 33 mit $3.464 \cdot 10^5$ CFU, ein Anteil von 10.09 % an der Gesamtpopulation, gefolgt von Typ 34 mit $3.438 \cdot 10^5$ CFU (10.01 %) und Typ 17 mit $2.292 \cdot 10^5$ CFU (6.68 %).

Über den gesamten Untersuchungszeitraum wurde die meisten CFU von Typ 28 mit $8.100 \cdot 10^6$ CFU isoliert, gefolgt von Typ 36 mit $6.486 \cdot 10^6$ CFU und Typ 8 mit $3.999 \cdot 10^6$ CFU (ohne Blatt 2 bei P3). Unter Berücksichtigung von Blatt 2 bei P3 wurden die meisten Kolonien von den Typen 25, 24 und 4 mit $1.300 \cdot 10^{11}$, $1.033 \cdot 10^{10}$ bzw. $5.169 \cdot 10^9$ CFU gezählt.

3.2.3 Rasterelektronenmikroskopie

Die rasterelektronische Untersuchung der Blattoberflächen erfolgte monatlich von Mai – Oktober 2003. Im Mai wurde jedoch kein Blattsegment untersucht, wie unter Material und Methoden beschrieben, sondern die Blattspitze (Ober- und Unterseite) von 2 verschiedenen Blättern.

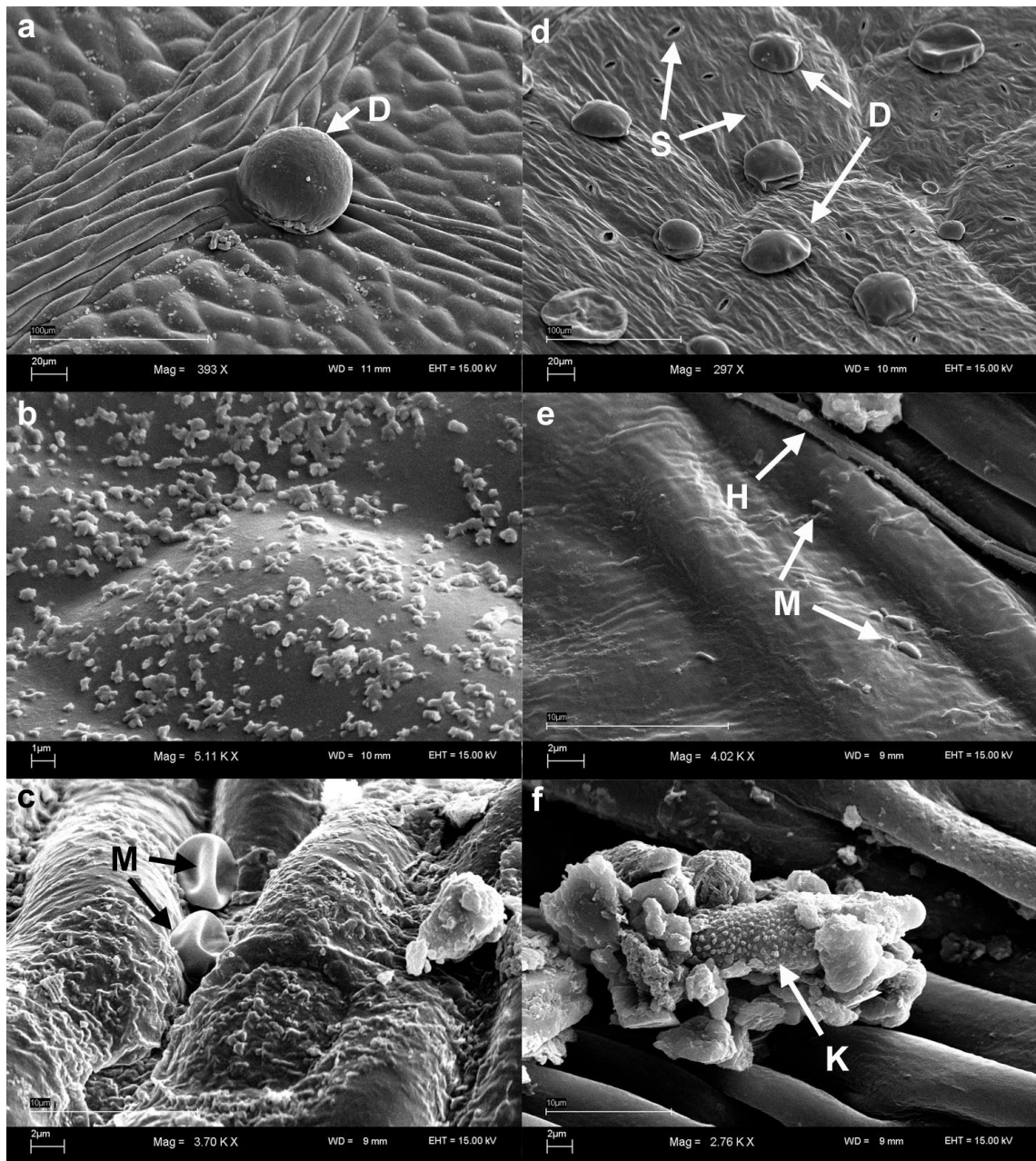


Abbildung 37 REM-Aufnahmen 16. Mai 2003 (P2)

Die Abbildungen a – c zeigen die adaxiale Seite, d – f die abaxiale Seite. Der Größenmaßstab ist auf jedem Bild angegeben. a) Drüse an einer Blattader; b) Wachskristalle; c) Mikroorganismen auf einer Blattader; d) Übersicht: Drüsen und Stomata; e) Hyphe und Mikroorganismen in der Nähe einer Blattader; f) Konidie umhüllt von Schmutzpartikeln auf einer Blattader. Abkürzungen: D Drüse, H Hype, K Konidie, M Mikroorganismus, S Stoma.

Die Beschreibung der Oberflächenmorphologie von *Juglans* erfolgt gemäß der Terminologie nach Barthlott & Ehler (1977) und Barthlott et al. (1998).

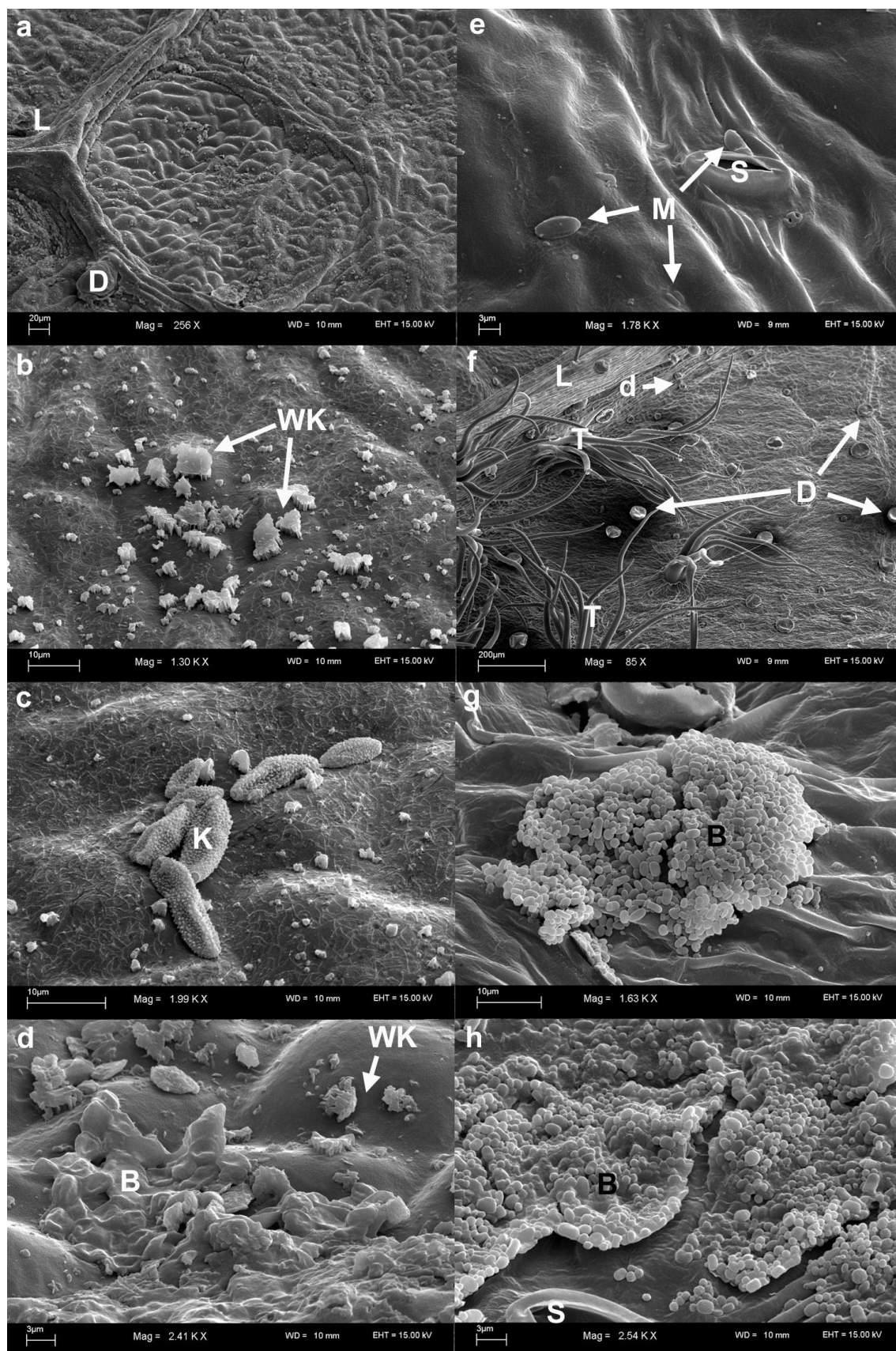


Abbildung 38 REM-Aufnahmen 13. Juni 2003 (P3)

Die Abbildungen a – d zeigen die adaxiale Seite, e – h die abaxiale Seite. Der Größenmaßstab ist auf jedem Bild angegeben. a) Übersicht der adaxialen Seite; b) Wachskristalle und fädige Wachstrukturen auf der Blattmitte; c) Konidien in der Blattmitte; d) Biofilm an der Blattspitze; e) Mikroorganismen in der Nähe eines Stoma, Blattspitze; f) Trichome in der Nähe der Mittelrippe; g) Biofilm in der Nähe der Mittelrippe; h) Biofilm in Assoziation mit einem Stoma in der Nähe der Mittelrippe. Abkürzungen: B Biofilm, D Drüse, d kleine Drüse, H Hyphe, K Konidie, L Leitbündel, M Mikroorganismus, S Stoma, T Trichom, Wk Wachskristalle.

Bei allen Proben wurde darauf geachtet, dass keine Verletzungen oder Nekrosen erkennbar waren. Die rasterelektronischen Aufnahmen von *Juglans regia* L. lieferten folgende Ergebnisse.

Veränderungen der Kutikula

Die Blätter von *Juglans* sind bifazial aufgebaut, mit einer netzförmigen Blattaderung. Stomata waren ausschließlich auf der abaxialen, dem Stängel abgewandten, unteren Blattseite, zu finden. Die Epidermiszellen waren elongiert-polygonal, die Antiklinalwände verliefen gerade. Auf der adaxialen Seite waren die Epidermiszellen konvex, die Antiklinalgrenzen versenkt und die Zellecken zeigten keine abweichende Struktur (Abbildung 37a). Der Verlauf der antiklinen Epidermiswände ist auf der abaxialen Seite weniger gut zu erkennen, was daran liegen mag, dass die Proben nicht fixiert wurden und durch das Vakuum z. T. einsanken. Die adaxiale und abaxiale Seite unterscheiden sich zudem hinsichtlich des Vorkommens von Drüsen und Haaren, und der Wachsmorphologie. Auf der adaxialen Seite fand man in geringer Dichte große kissenförmige Drüse in direkter Nähe zu Blattadern (Abbildung 37a). Ein kleinerer Drüsentyp wurde sehr selten ebenfalls in Assoziation mit Blattadern gefunden. Auf der abaxialen Seite fand man beide Drüsentypen, die kleineren Drüse waren stets mit Blattadern assoziiert, wohingegen die großen Drüsen keine bevorzugte Lokalisation erkennen ließen (Abbildung 37d). Auf der abaxialen Seite kamen zusätzlich in den Achseln der, von der Mittelrippe abzweigenden Blattadern, Trichombündel vor (Abbildung 38f). Auf der adaxialen Seite bildeten sich Wachskristalle (Abbildung 37b), während die abaxiale Seite von einem Wachsfilm überzogen war (Abbildung 37e). Die epikutikularen Wachse auf der adaxialen Seite durchliefen während der Saison eine Entwicklung.

Epiphyll Mikroorganismen

Zu Beginn, im Mai, waren sie heterogen auf der Kutikula verteilt, es gab große Bereiche, die von einem Film überzogen waren (Abbildung 37a), andere Bereiche waren mit Kristallen aus oben aggregierten Plättchen überzogen (Abbildung 37b); auf den Blattadern bildeten sich Krusten (Abbildung 37c). Im Juni waren die aggregierten Plättchen deutlich häufiger (Abbildung 38a) und größer als im Vormonat, zudem fanden sich, außer an der Blattspitze, feine fädige Strukturen auf der gesamten adaxialen Seite (Abbildung 38b - d).

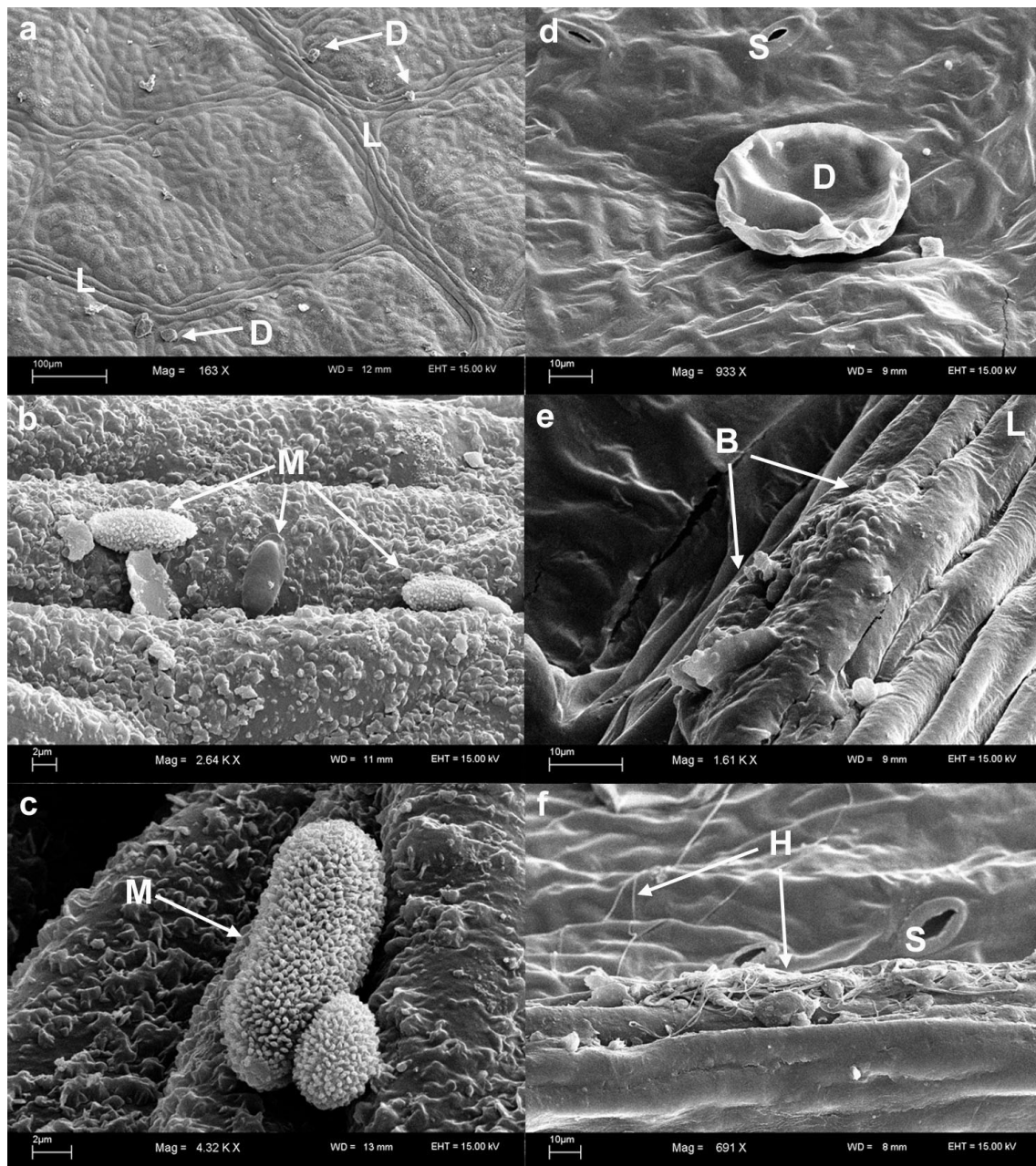


Abbildung 39 REM-Aufnahmen 18. Juli 2003 (P5)

Die Abbildungen a – c zeigen die adaxiale Seite, d – f die abaxiale Seite. Der Größenmaßstab ist auf jedem Bild angegeben. a) Übersicht der adaxialen Seite; b) Mikroorganismen auf einer Blattader in der Nähe der Mittelrippe; c) Mikroorganismen am Blattrand; d) Übersicht aus der Blattmitte; e) Biofilm am Blattrand; f) Pilzhyphe am Blattrand. Abkürzungen: B Biofilm, D Drüse, Drüse, H Hyphe, K Konidie, M Mikroorganismus, S Stoma.

Im Juli war die gesamte adaxiale Seite dicht mit epikutularen Wachskristallen belegt, und erscheint daher auf der Photographie weißlich (Abbildung 39a). Die Ränder der Aggregate waren zum Teil nicht mehr scharf abgegrenzt, sondern abgerundet (Abbildung 39c).

Die fädigen Strukturen auf der Blattoberseite waren nicht mehr vorhanden. Im August waren die Wachskristalle zum Teil weniger dicht und abgerundeten Kanten vorhanden (Abbildung 40b), aber auch noch mit scharfer Abgrenzung (Abbildung 40c). In den nächsten zwei Monaten fand eine

starke Erosion der Wachse statt. Die Aggregate wurden zunehmend abgerundet und abgetragen (Abbildung 42a). Auf der adaxialen Seite nahm die Verschmutzung der Oberfläche ab August deutlich zu (Abbildung 40b, Abbildung 41a). Auf der Blattunterseite ließ sich hinsichtlich des Wachsfilmes während des Untersuchungszeitraumes keine Veränderung beobachten.

Im Mai (P2) konnte auf der Blattoberfläche vereinzelte, nicht ausgekeimte Konidien auf beiden Seiten beobachtet werden (Abbildung 37f). Einzelne Mikroorganismen wurden in Vertiefungen zwischen Leitbündelzellen (Abbildung 37c) und auf der abaxialen Seite (Abbildung 37e) beobachtet; Hyphen waren kaum zu finden (Abbildung 37e).

Im Juni (P3) wurden auf der adaxialen Seite vermehrt ausgekeimte Konidien beobachtet. Diese befanden sich häufig an geschützten Stellen in direkter Nähe zu Leitbündelverzweigungen. Noch nicht ausgekeimte Konidien traten zunehmend in kleinen Agglomerationen auf (Abbildung 38c). Bei einem Biofilm auf der Oberseite war deutlich zu erkennen, dass die Organismen in eine Matrix eingebettet waren (Abbildung 38d). Zusätzlich wurden auch Hefen gefunden. Auf der Unterseite befanden sich einzelne Mikroorganismen in der Nähe von Stomata (Abbildung 38e) oder aber, wie bereits im Mai, in Vertiefungen zwischen Leitbündelzellen. Wie auch auf der Oberseite, waren Konidien auf der Unterseite vorhanden, jedoch wenig ausgekeimte. In der Nähe der Trichome, in den Nervenwinkeln (Abbildung 38f), wurden mehrere Biofilme gefunden. Diese waren mit Leitbündeln, Stomata und großen Drüsen assoziiert (Abbildung 38g, h). Die räumliche Ausdehnung der Biofilme war variabel, sie reichte von 50 x 50 µm (Abbildung 38g) bis zu 300 x 100 µm. Die Biofilme setzten sich aus vielen, verschiedenen Organismen zusammen (Abbildung 38g, h; Abbildung 51) und sind in eine zum Teil sehr gut erkennbare Matrix (Abbildung 38h) eingebettet.

Im Juli (P5) wurden auf beiden Blattseiten kaum Mikroorganismen gefunden, nur vereinzelte Konidien (Abbildung 39b, c), ein kleiner Biofilm (Abbildung 39e) und Pilzhypen am Blattrand (Abbildung 39f).

Im August (P6) befanden sich auf der adaxialen Seite deutlich mehr Konidien, die zu einem größeren Teil als im Juni ausgekeimt hatten (Abbildung 40d); einzelne Mikroorganismen und ein Biofilm auf einem Leitbündel (Abbildung 40b) konnten beobachtet werden. Auf der abaxialen Seite befanden sich in der Nähe der Trichome erneut große Biofilme (Abbildung 40e – g).

Ein Biofilm trat in direkter Nähe zu einem kleinen Insekt auf (Abbildung 40g). Ein bandförmiger Biofilm auf der Blattunterseite, könnte eventuell durch die Kriechspur einer kleinen Raupe entstanden sein (Abbildung 40h). Es fanden sich deutlich mehr Hyphen als im Juni und Juli.

Im September (P7) hatte die Besiedlung auf beiden Blattseiten gegenüber dem Vormonat zugenommen. Vor allem der Anteil an Konidien war gestiegen (Abbildung 41a, b). Zusätzlich konnten einige Nekrosen entdeckt werden (Abbildung 40c, f). Diese waren makroskopisch nicht erkennbar

gewesen. Auf beiden Bildern lässt sich gut erkennen, dass der Rand der Nekrose angehoben war und an den Aufbruchstellen Hyphen austraten.

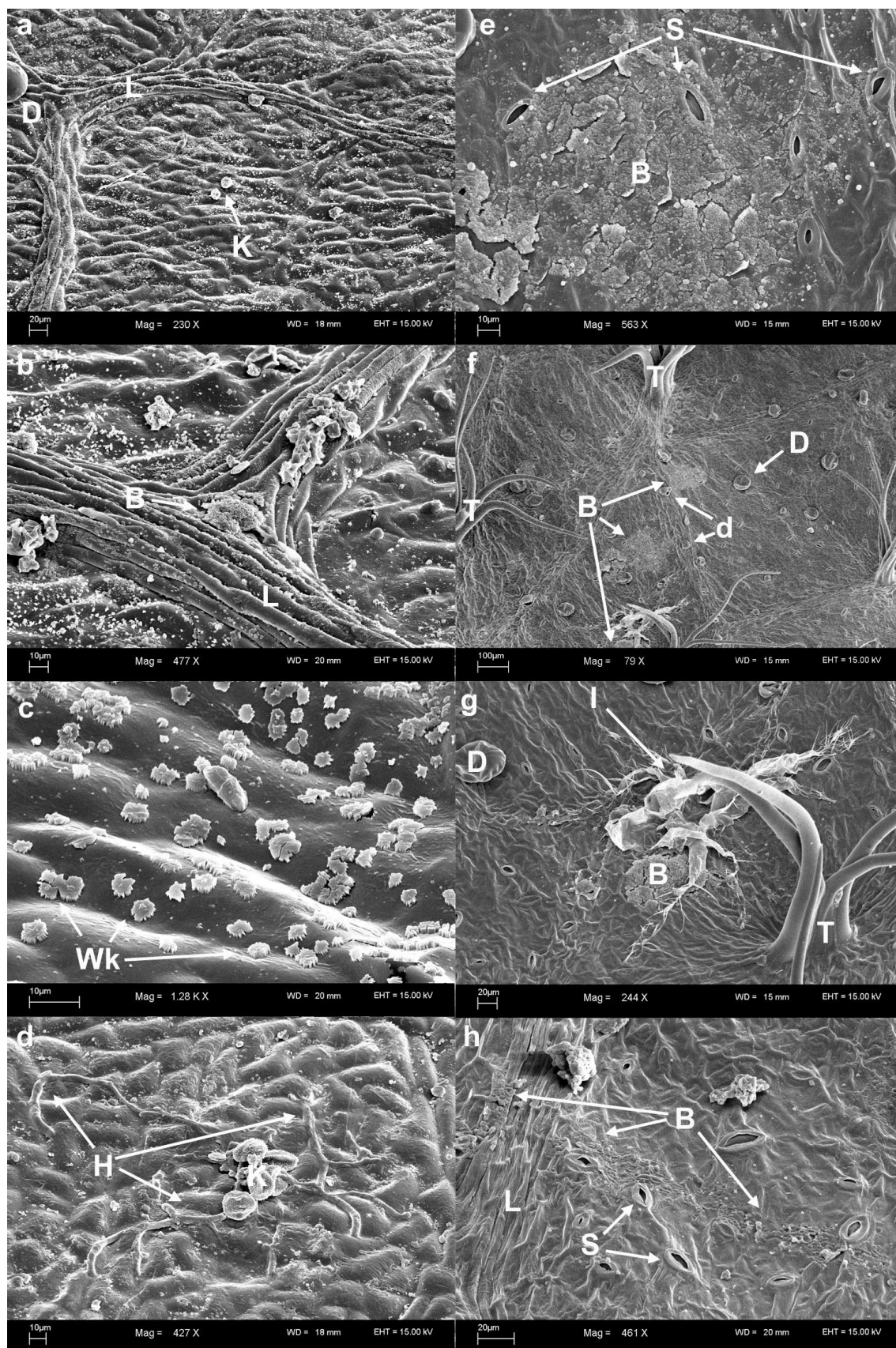


Abbildung 40 REM-Aufnahmen 14. August 2003 (P6)

Die Abbildungen a – d zeigen die adaxiale Seite, e – h die abaxiale Seite. Der Größenmaßstab ist auf jedem Bild angegeben. a) Übersicht der adaxialen Seite; b) Biofilm auf einem Leitbündel in der Blattmitte; c) Wachskristalle in der Nähe der Mittelrippe; d) ausgekeimte Konidien und Hyphen am Blattrand; e) Biofilm neben Stomata in der Nähe der Mittelrippe; f) Biofilme in der Nähe der Mittelrippe; g) Ausschnittvergrößerung des Biofilms in der unteren Mitte von Bild f; h) Biofilm in der Nähe der Mittelrippe. Abkürzungen: B Biofilm, D Drüse, d kleine Drüse, H Hyphe, I Insekt, K Konidie, L Leitbündel, S Stoma, T Trichom, Wk Wachskristalle.

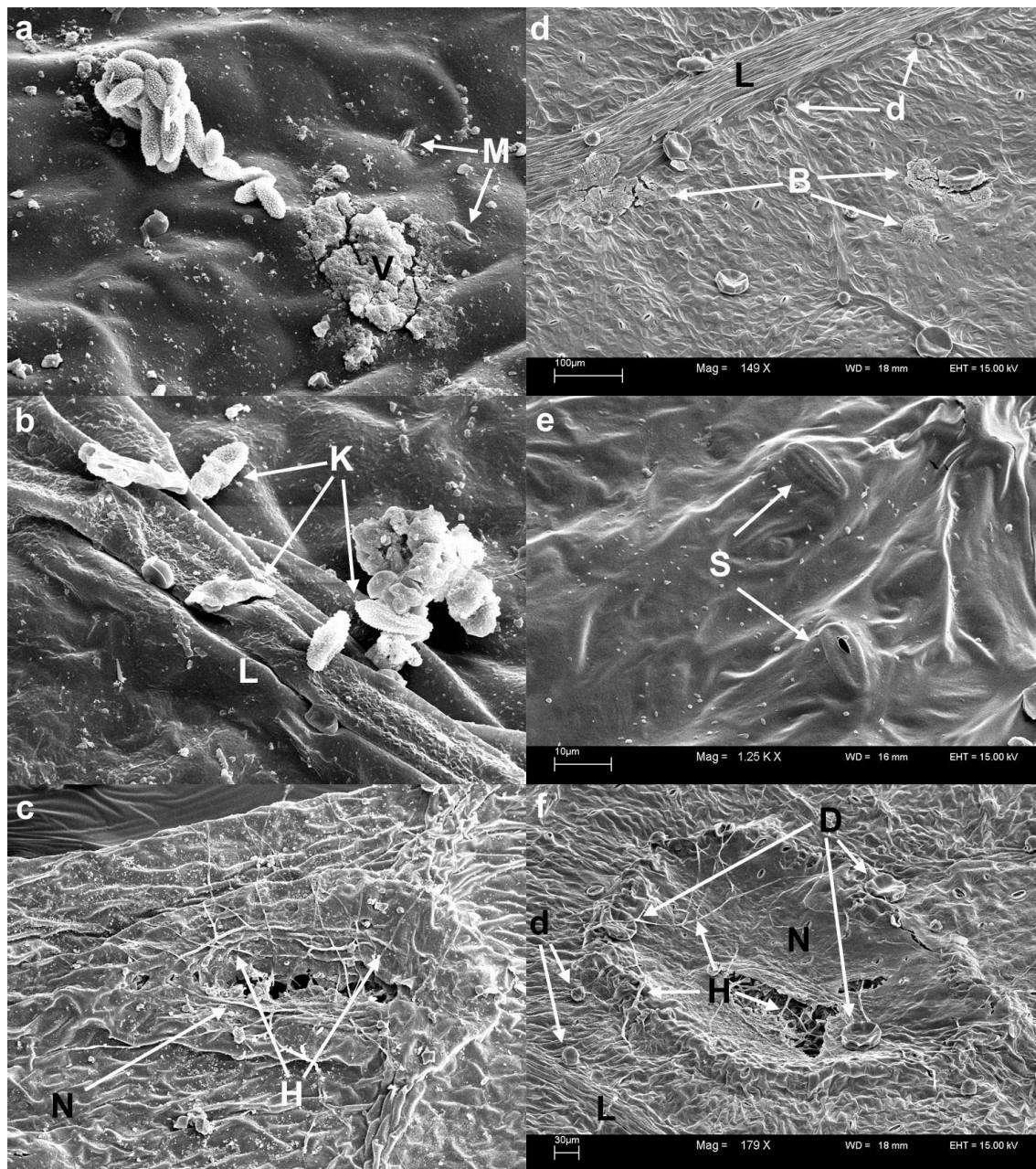


Abbildung 41 REM-Aufnahmen 16. September 2003 (P7)

Die Abbildungen a – c zeigen die adaxiale Seite, d – f die abaxiale Seite. Auf den Bildern a – c ist durch ein Versehen die Einstellung nicht aufgezeichnet worden. Der Größenmaßstab ist auf den übrigen Bildern angegeben. a) Konidien am Blattrand; b) Konidien auf der Blattmitte; c) Nekrose neben einer Blattader. d) Biofilme in der Nähe der Mittelrippe; e) Blattoberfläche in der Nähe der Mittelrippe; f) Nekrose in der Blattmitte. Abkürzungen: B Biofilm, D Drüse, d kleine Drüse, H Hype, L Leitbündel, K Konidie, M Mikroorganismen, N Nekrose, S Stoma, V Verschmutzung.

Im Oktober (P8) konnten noch mehr Mikroorganismen auf beiden Blattseiten beobachtet werden. Die Anzahl der Nekrosen hatte sich vergrößert, sie wurden häufig in der Nähe von Blattadern gefunden (Abbildung 42c). Die Anzahl der ausgekeimten Konidien war im Vergleich zu den Vormonaten gestiegen. Zahlreiche Biofilme wurden im Bereich der Trichome gefunden. Die Mikroorganismen besiedelten seit September die großen Drüsen einzeln oder als Biofilm; in den Monaten zuvor konnten sie nur in direkter Nähe zu den Drüsen beobachtet werden, aber nicht auf selbigen (Abbildung 42d, f).

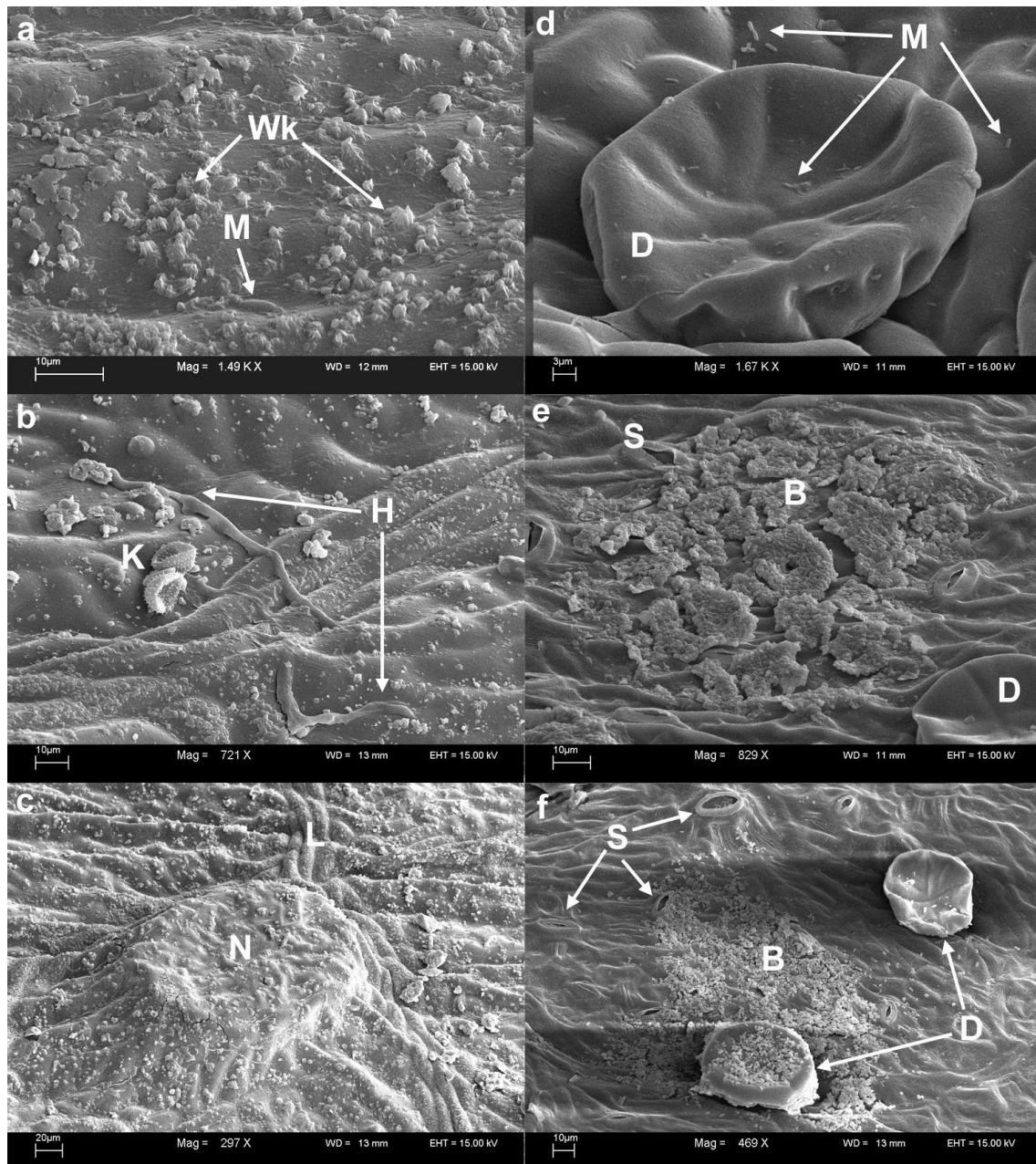


Abbildung 42 REM-Aufnahmen 14. Oktober 2003 (P8)

Die Abbildungen a – c zeigen die adaxiale Seite, d – f die abaxiale Seite. Der Größenmaßstab ist auf jedem Bild angegeben. a) Wachskristalle am Blattrand; b) ausgekeimte Konidien und Hyphen in der Blattmitte; c) Nekrose neben einer Blattader im Blattrandbereich d) einzelne Mikroorganismen auf und in der Nähe einer Drüse; e) Biofilm in der Nähe der Mittelrippe; f) Biofilm in der Nähe und auf einer Drüse. Abkürzungen: B Biofilm, D Drüse, H Hype, K Konidie, M Mikroorganismus, N Nekrose, S Stoma.

3.2.4 Lichtmikroskopie

Die lichtmikroskopische Untersuchung von *Juglans*-Blattoberflächen wurde an Frischmaterial durchgeführt (2.1.3). Auf der adaxialen Seite wurden die Mikroorganismen hauptsächlich einzeln oder in kleinen Aggregaten gefunden (Abbildung 43a), seltener Biofilme (Abbildung 43b). Auf der abaxialen Seite konnten große Biofilme beobachtet werden. Die Biofilme waren häufig mit großen Drüsen assoziiert (Abbildung 43c, d). Die Mikroorganismen waren in eine Matrix eingebettet, wie deutlich in Abbildung 43d erkennbar ist. Die kleinen Drüsen sind stets in Nähe von Leitbahnen zu finden (Abbildung 43c), sie scheinen sehr durchlässig für die Färbelösung zu sein, da die Zellkerne angefärbt wurden (Abbildung 43d).

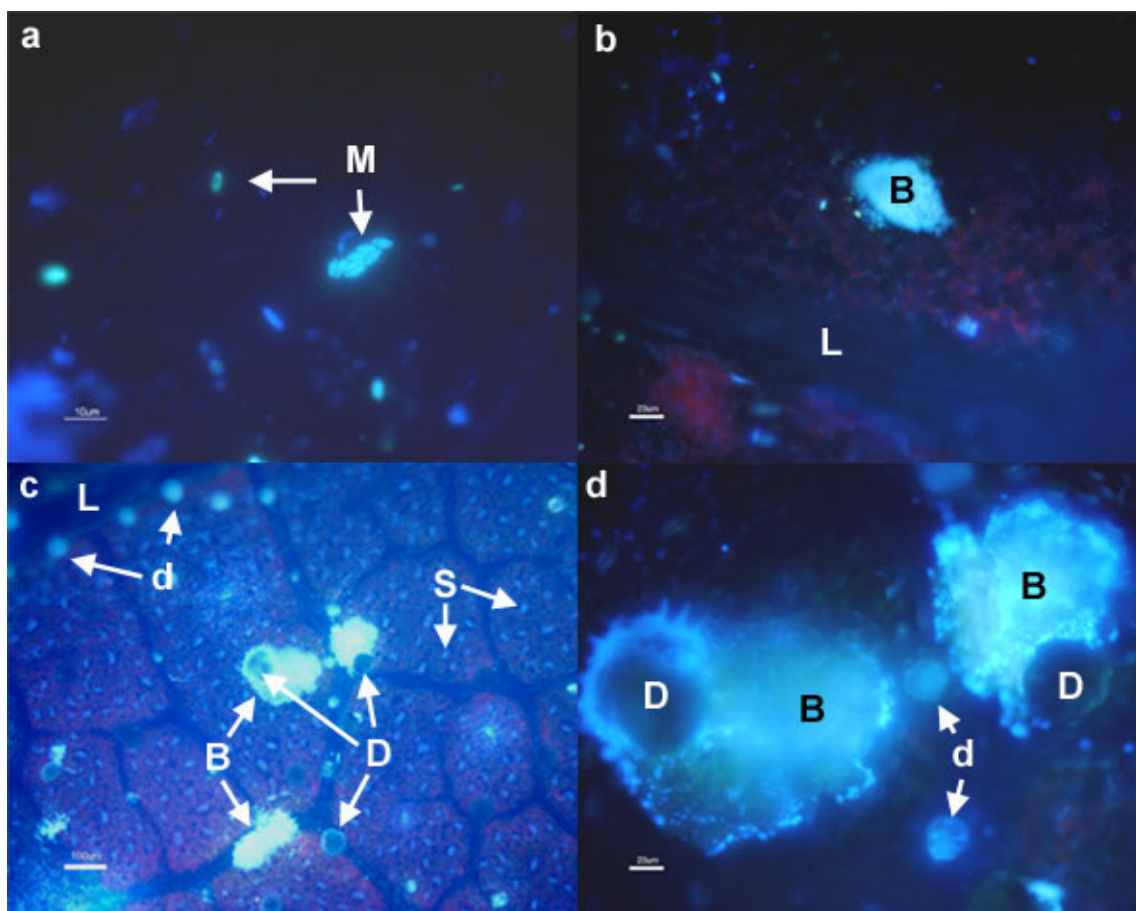


Abbildung 43 Biofilme auf *Juglans regia* L., Juni 2003

Färbung mit DAPI wie unter 2.1.3 beschrieben, Filtersatz 01. a) vereinzelte Mikroorganismen auf der adaxialen Seite, Marker = 10 µm; b) Biofilm auf der adaxialen Seite, Marker = 20 µm; c) Biofilme auf der abaxialen Seite, Marker = 100 µm; d) Biofilme auf der abaxialen Seite, Marker = 20 µm. Abkürzungen: B Biofilm, d kleine Drüse, D Drüse, L Leitbündel, M Mikroorganismus, S Stoma.

3.2.5 Wasserpermeabilität

Die Messungen fanden an *Juglans*-Blattscheiben (LD) im Mai, Juni, Juli, September und Oktober 2003 statt. Es erfolgten mindestens vier Messungen je Messpunkt. In Abbildung 44 sieht man beispielhaft den Fluss von radioaktiv markiertem Wasser von *Juglans*-LD im September 2003.

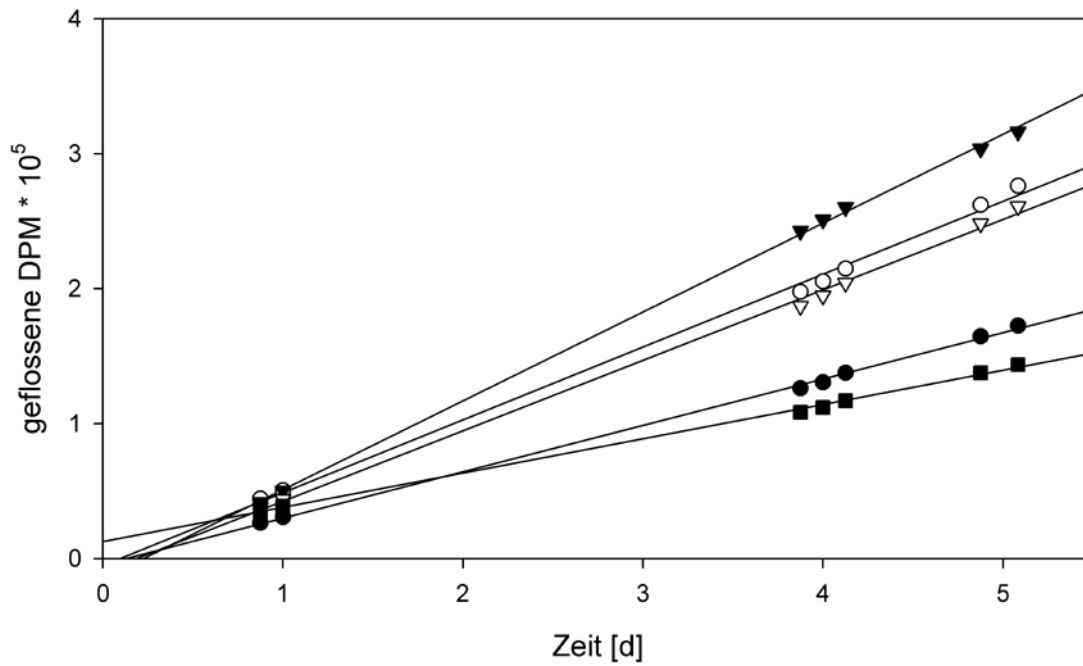


Abbildung 44 Flussdiagramm *Juglans regia* - Blattscheiben, September 2003

Die einzelnen Werte einer Messreihe sind durch eine Ausgleichsgerade verbunden.

Die Wasserpermeabilität (Abbildung 45) betrug im Mai $18.6 \cdot 10^{-10} \text{ m s}^{-1}$ ($+ 8.18 \cdot 10^{-10}$, $- 5.68 \cdot 10^{-10}$), im Juni war die Permeabilität um 59 % auf $7.72 \cdot 10^{-10} \text{ m s}^{-1}$ ($+ 1.51 \cdot 10^{-10}$, $- 1.26 \cdot 10^{-10}$) gesunken; die Signifikanz S betrug 98.96 % gegenüber dem Vormonat. Im Juli sank die Durchlässigkeit um 45 % auf $4.28 \cdot 10^{-10} \text{ m s}^{-1}$ ($+ 1.07 \cdot 10^{-10}$, $- 8.49 \cdot 10^{-10}$) ($S = 99.96 \%$). Im September war die Permeabilität auf das 2.2fache des Vormonates $9.43 \cdot 10^{-10} \text{ m s}^{-1}$ ($+ 1.87 \cdot 10^{-10}$, $- 1.562 \cdot 10^{-10}$) angestiegen ($S = 100$). Auch im Oktober erhöhte sich die Permeabilität um 33 % auf $12.7 \cdot 10^{-10} \text{ m s}^{-1}$ ($+ 5.17 \cdot 10^{-10}$, $- 3.67 \cdot 10^{-10}$) ($S = 88.83$).

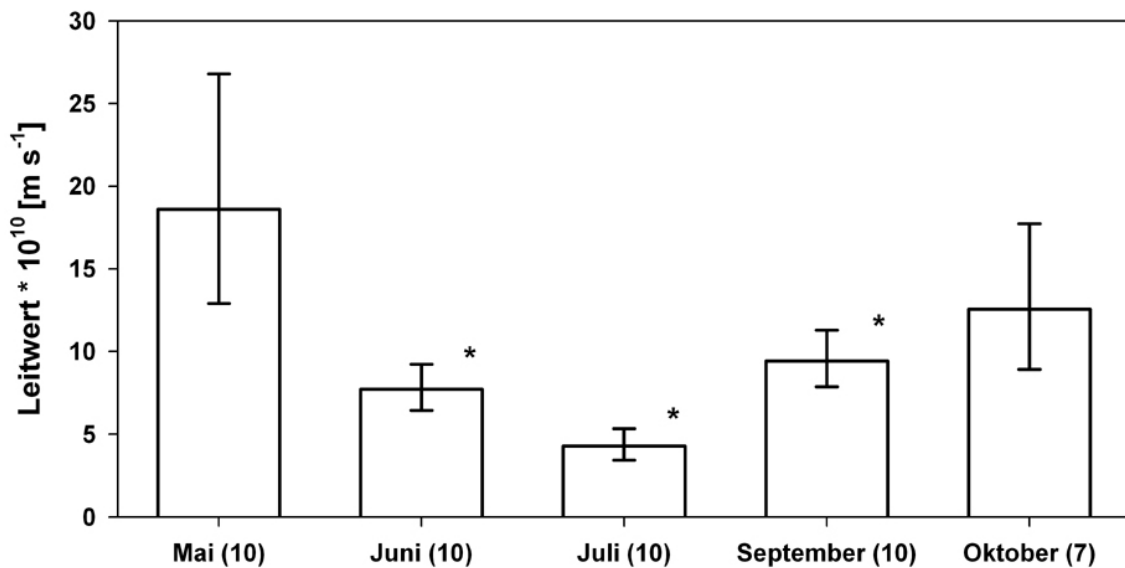


Abbildung 45 Wasserpermeabilität von *Juglans*-Blattscheiben

Mittelwerte nach log-Transformation, Fehlerbalken = 95 % - Vertrauensbereich, n = Zahlen in Klammern, * = Wert unterscheidet sich vom vorherigen Wert auf 95 % Niveau signifikant.

3.2.6 Wachsanalyse

Die Wachsextraktion wurde gemäß den Angaben in Kapitel 3.1.10 in den Monaten Mai, Juni, Juli und September 2003 durchgeführt. Im Oktober wurde kein Wachs extrahiert, da die Blätter bereits stark nekrotisiert waren und Fraßspuren aufwiesen; die Extraktion von Pflanzeninhaltsstoffen wäre sehr wahrscheinlich gewesen. Es wurde jeweils von mehreren Blättern in einer Extraktion Wachs gewonnen (gepoolte Probe), welches in einer Einfachbestimmung analysiert wurde, daher können keine statistischen Abweichungen angegeben werden.

Im Mai war die Wachsbelegung mit $7.95 \mu\text{g cm}^{-2}$ am niedrigsten. Während der nächsten Monate stieg sie bis Juli um 60 % auf $12.7 \mu\text{g cm}^{-2}$ an. Bis zum September sank der Wert dann wieder um 41 % auf $9.04 \mu\text{g cm}^{-2}$ (Tabelle 9). Die absolute Verteilung der einzelnen Substanzklassen folgte mit Ausnahme der Säuren und Aldehyde dem saisonalen Verlauf des Gesamtwachses (Abbildung 46). Es konnten zwischen 80 und 86 % der Wachsinhaltsstoffe identifiziert werden (Tabelle 9).

Das Wachs der Walnuss wird von zwei Substanzen dominiert, die zusammen 36 – 50 % des Wachses ausmachen. Hexacosanol, ein primärer Alkohol mit 26 Kohlenstoffatomen (C_{26}), hatte einen Anteil von 38 % im Mai und 27 % im September; Tetracosanol, ein C_{24} -Alkohol, einen Anteil von 11 – 13 % (Abbildung 48). Zusammen mit weiteren primären Alkoholen der Kettenlängen 22 – 34 stellen sie die Hauptverbindungsklasse mit 65 % im Mai und Juni, im Juli und September sank der Anteil auf 53 % (Abbildung 47, Tabelle 9). Die Kettenlängen sind linksgipfelig

verteilt, mit einem Maximum bei 26. Die geradzahlgigen Kettenlängen dominieren, die ungeradzahlgigen Kettenlängen von 23 – 33 sind schwach vertreten, 29 konnte nicht detektiert werden.

Tabelle 9 Wachsbelegung und –Zusammensetzung im jahreszeitlichen Verlauf

Die Substanzklassenverteilung ist in Prozent angegeben. Es handelt sich um gepoolte Proben von mehreren Blättern, daher wurden keine statistische Angaben gemacht.

	Mai	Juni	Juli	September
Gesamtwachs [$\mu\text{g cm}^{-2}$]	7.95	11.7	12.7	9.04
Substanzklassenverteilung [%]				
primäre Alkohole	64.8	65.5	53.5	53.2
Alkane	6.66	6.96	7.89	10.2
Säuren	7.27	3.57	4.66	4.96
Ester	1.11	2.30	2.61	3.18
Aldehyde	1.43	0.45	0.76	0.34
Triterpene und Steroide	4.36	6.20	9.94	13.4
Identifizierte Substanzen	85.65	85.00	79.35	85.20

Der Anteil der Alkane am Gesamtwachs betrug im Mai 7 % und stieg bis September um 50 % auf 10 % an (Abbildung 47, Tabelle 9). Alkane der Kettenlängen 23 – 33 konnten detektiert werden. Die Alkane mit den Kettenlängen C_{24} und C_{25} konnten nicht bestimmt werden; ein C_{24} -Alkan wurde als Standard verwendet und überlagerte somit ein evtl. vorhandenes Signal aus der Probe; bei der erwarteten Retentionszeit für den C_{25} -Alkan wurde ein Weichmacher detektiert, der ebenfalls das Signal überlagert haben könnte. Die Verteilung ist rechtsgipfelig mit einem Maximum bei C_{31} (Hentriacontan), Alkane ungerader Kettenlängen dominieren. Die saisonale Zunahme erfolgte nicht gleichmäßig über die verschiedenen Kettenlängen, sondern fand überdurchschnittlich stark bei den beiden Hauptalkanen Hentriacontan (C_{31}) und Nonacosan (C_{29}) statt (Abbildung 48).

Der Anteil der Säuren betrug im Mai 7.3 %, sank im Juni auf 3.5 % und stieg bis September auf 5 % an (Tabelle 9, Abbildung 48). Es wurden Säuren der Kettenlängen C_{16} – C_{34} identifiziert. Die geradzahlgigen Kettenlängen dominieren, die Verteilung ist annähernd normal mit einem Maximum bei C_{24} (Ausnahme Mai, Maximum bei C_{26}). Von den ungeradzahlgigen Kettenlängen konnten nur die C_{23} - und C_{25} -Säure detektiert werden. Mit Ausnahme der C_{25} -, C_{28} - und C_{34} -Säure nahm der prozentuale Anteil der restlichen Säuren nach Juni stetig zu. Bei einigen Säuren war der Anteil im Mai höher und sank zum Juni, was sich durch die Zunahme der Ester erklären lässt (Abbildung 48, Abbildung 49).

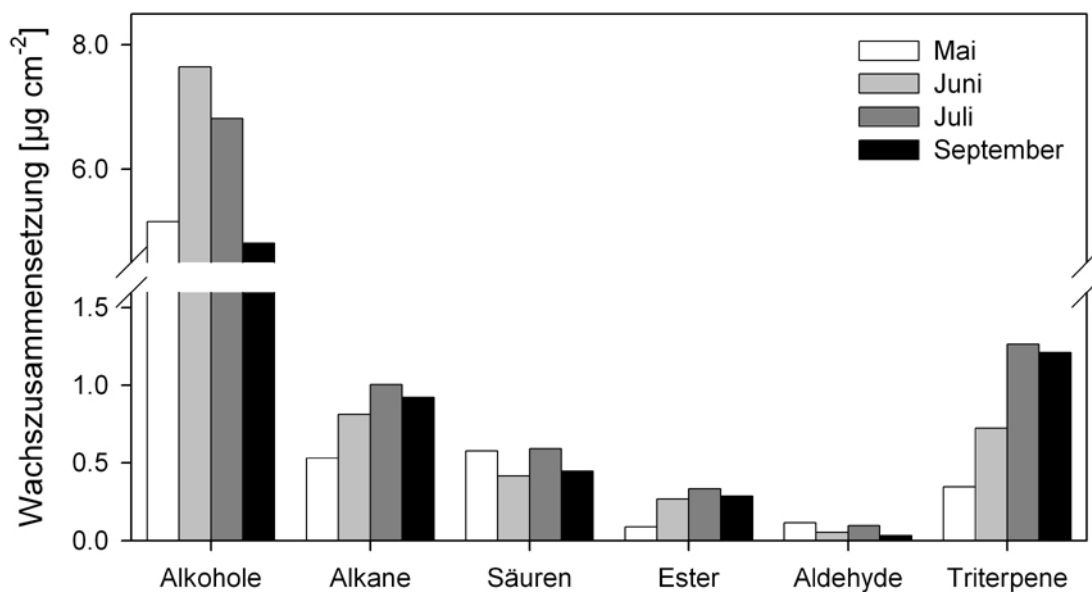


Abbildung 46 Wachszusammensetzung in $\mu\text{g cm}^{-2}$ aufgeschlüsselt nach Substanzklassen im jahreszeitlichen Verlauf

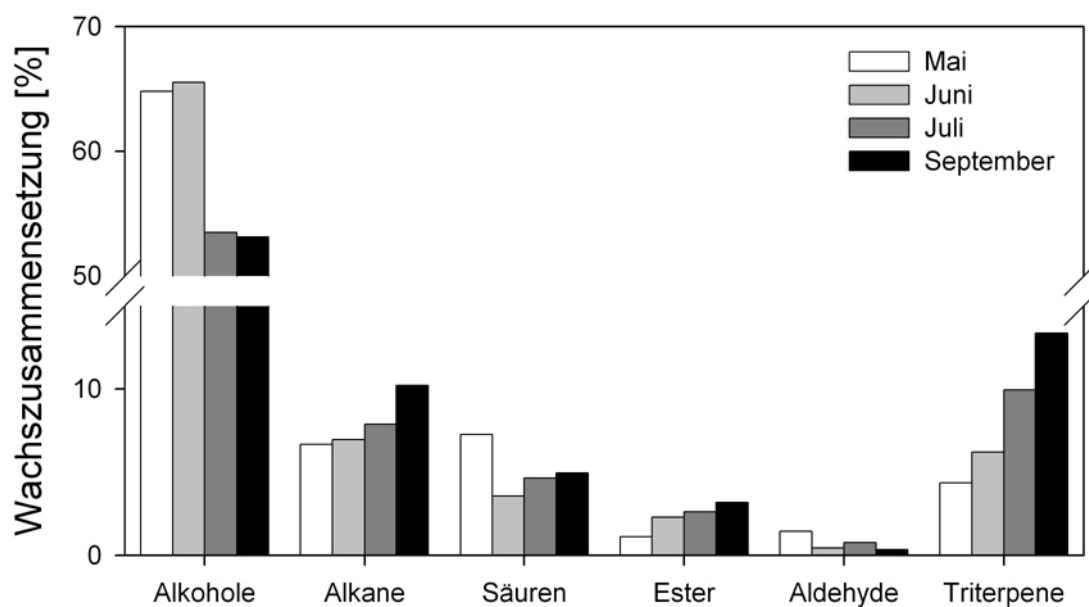


Abbildung 47 Wachszusammensetzung in Prozent aufgeschlüsselt nach Substanzklassen im jahreszeitlichen Verlauf

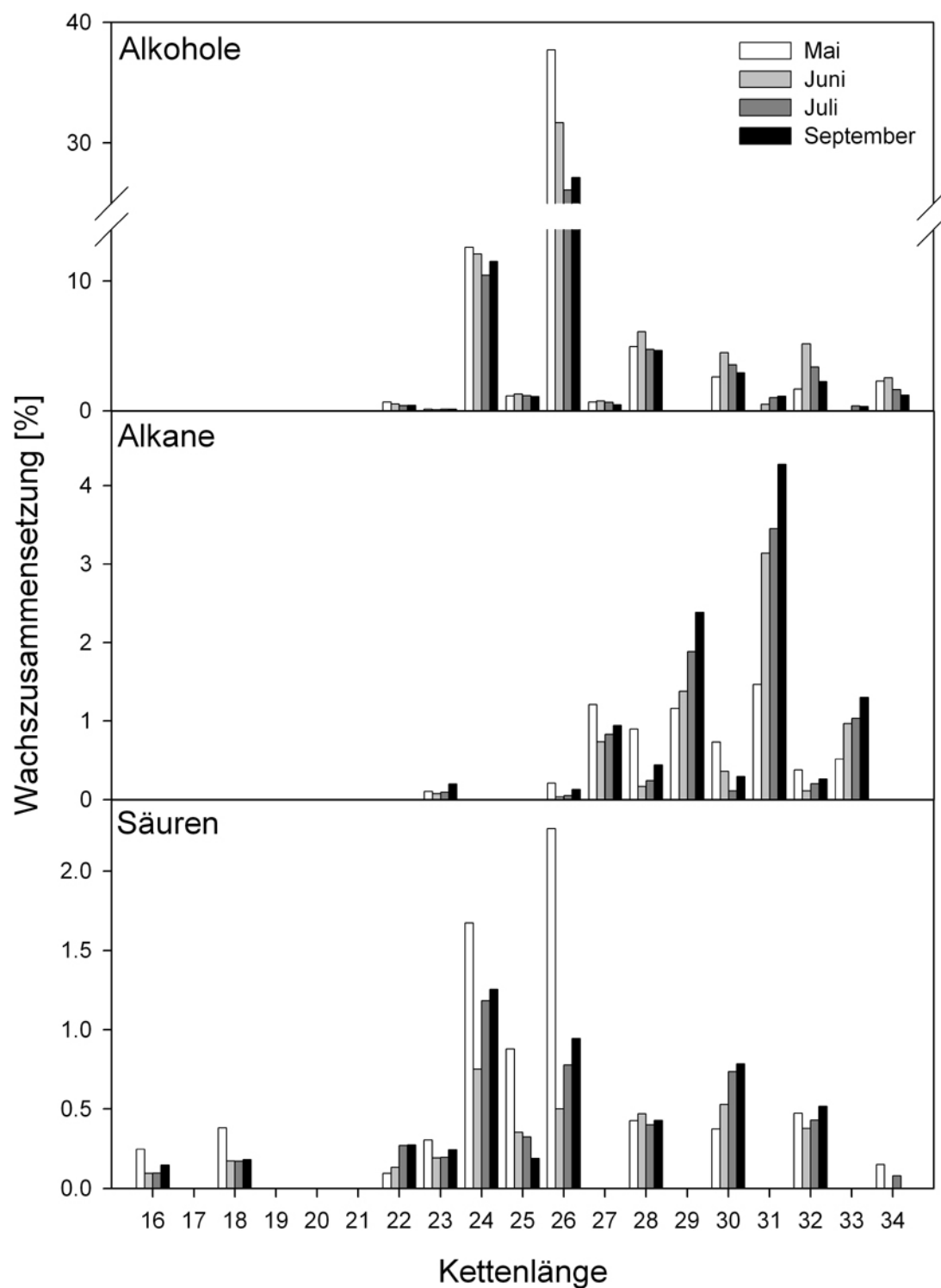


Abbildung 48 Saisonale Entwicklung der Kettenlängenverteilung innerhalb der Substanzklassen Alkohole, Alkane und Säuren

Der Anteil der Ester betrug im Mai 1.1 % und stieg bis September stetig auf 3.2 % an (Tabelle 9, Abbildung 47). Es konnten ausschließlich Ester der geradzahligen Kettenlängen C_{40} – C_{46} detektiert werden. Bei den Estern C_{40} – C_{44} handelt es sich um Ester aus der C_{16} -Säure mit den C_{24} - C_{28} -Alkoholen. Bei dem C_{46} -Ester ließ sich die Zusammensetzung anhand des Zerfallsmusters nicht näher bestimmen. Im Mai konnten nur die C_{40} - und C_{42} -Ester detektiert werden, ab Juni dann auch C_{44} – C_{46} . Der C_{46} - Ester war im September nicht mehr detektierbar. Der Anteil der einzelnen Ester nahm im saisonalen Verlauf zu, wobei die C_{42} - und C_{44} -Ester etwas stärker anstiegen (Abbildung 49).

Aldehyde konnten nur zu einem geringen Prozentsatz von anfangs 1.4 % detektiert werden und sanken bis September auf 0.3 % (Tabelle 9, Abbildung 47).

Triterpene und Steroide wurden zu einer Klasse (Triterpene) zusammengefasst; deren prozentualer Anteil stieg stetig von 4.4 % im Mai auf 13.4 % im September (Tabelle 9, Abbildung 47). Sie zählen neben den Alkoholen und Alkanen zu den Hauptbestandteilen des Walnusswachses. Dominiert wird diese Substanzklasse durch zwei Triterpene, α -Amyrin und β -Amyrin, die zusammen bis zu 44 % der Triterpene und Steroide repräsentierten.

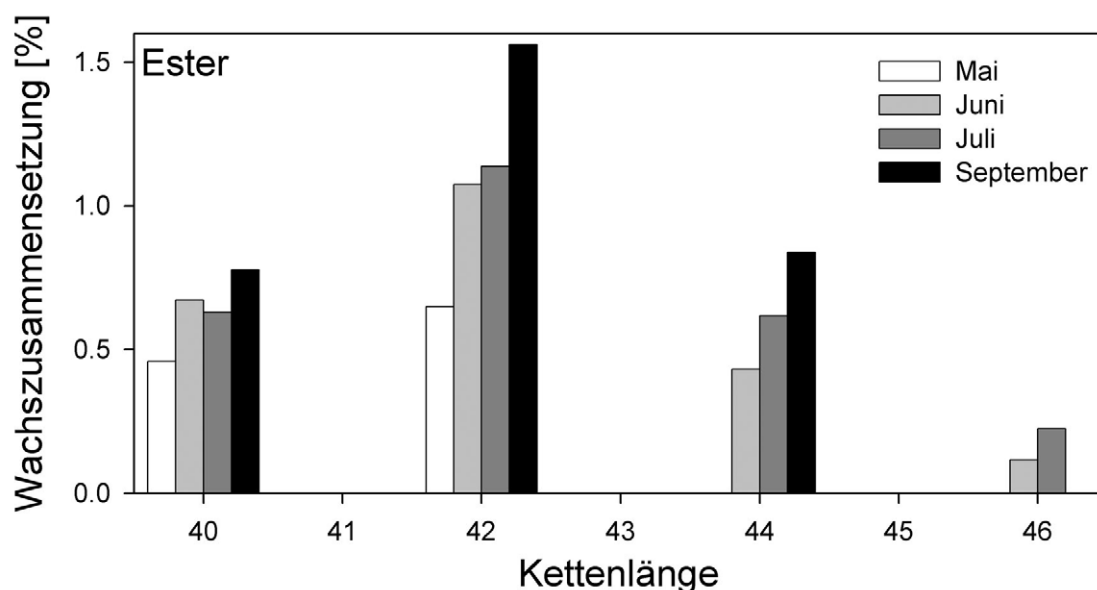


Abbildung 49 Saisonale Entwicklung der Kettenlängenverteilung innerhalb der Substanzklasse der Ester

3.3 Diskussion

3.3.1 Artenspektrum

In der Literatur wurden bisher 181 verschiedene Bakterienarten in der Phyllosphäre von 47 verschiedenen Ursprungspflanzen beschrieben, diese sind in Tabelle 10 (Seite 86 ff) aufgelistet. Diese Liste erhebt keinen Anspruch auf Vollkommenheit, sondern soll einen Überblick über bisherige Arbeiten geben; es handelt sich um 42 Veröffentlichungen, sowie um eigene, unveröffentlichte Daten und Daten aus der vorliegenden Arbeit. Diese 181 Arten gehören 85 verschiedenen Gattungen an, die sich wiederum auf 41 Familien verteilen, welche 17 Ordnungen entstammen. Die meisten bisher identifizierten Phyllosphärenbakterien sind Gram-negative γ -Proteobacteria, insbesondere Arten aus den Familien der Pseudomonadaceae und Enterobacteriaceae. Von Gram positiven Bakterien mit einem hohen GC-Gehalt (z. B. *Bacillus*, *Enterococcus*) wurden ebenso viele Arten gefunden wie von Gram-positiven Bakterien mit einem niedrigen GC-Gehalt (z. B. *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Curtobacterium*). Arten der α - und β -Proteobacteria wurden bisher noch in geringerem Umfang identifiziert. In dieser Arbeit konnten wurden 33 Stämme mittels ARDRA, Sequenz- und Stammbaumanalyse phylogenetisch eingeordnet werden; für drei Isolate war keine Zuordnung möglich. Die Mehrheit der Isolate von *Juglans regia* L. gehört zur den Gram-negativen Proteobacteria (7 α -Proteobacteria, 3 β -Proteobacteria und 18 γ Proteobacteria). Ferner konnten noch fünf Gram-positive Stämme identifiziert werden. Vier der 36 Stämme waren bisher noch nicht auf Pflanzen beschrieben worden (*Caulobacter* sp., *Afipia* sp., *Acinetobacter johnsonii* und *Bacillus fusiformis*). Bei der Beurteilung der Ergebnisse der Sequenzanalyse der 16S rDNA ist zu bedenken, dass es sich bei einer Homologie von weniger als 97 % sehr wahrscheinlich um zwei verschiedenen Arten handelt. Bei einer Homologie von mehr als 97 % kann es sich um die gleiche Art handeln, es können aber auch zwei verschiedene Arten sein (Forney et al. 2004). Die Analyse 16S rDNA ist hilfreich, um Bakterien phylogenetisch einzuordnen, zur Bestimmung ist sie nicht geeignet.

Gram-negative Arten

α -Proteobacteria

Aus der Abteilung der α -Proteobacteria wurden aus den Gattungen *Caulobacter* und *Methylobacterium* je zwei Stämme identifiziert, aus den Gattungen *Sphingomonas* und *Afipia* je einen Stamm. Ein Isolat konnte nicht näher bestimmt werden.

Die Sequenzanalyse von Typ 36 ergab eine Zugehörigkeit zu den α -Proteobacteria (Tabelle 10), dies zeigte auch der Stammbaum (Abbildung 34); eine bessere Einordnung war nicht möglich.

Die Gattung *Sphingomonas* aus der Familie der Sphingomonadaceae gehört zur Ordnung der Sphingomonadales (The Prokaryotes, ein online verfügbares Buch aus dem Stringer Verlag). Sie sind chemoheterotroph, strikt aerob und bilden typischerweise gelbe Kolonien, auch orange pigmentierte Arten sind beschrieben (Busse et al. 2003). Sie sind sowohl in aquatischen als auch terrestrischen Habitaten zu finden und können viele verschiedene, natürlich auftretende, organische Verbindungen metabolisieren ebenso technische Produkte wie Polyethylenglykol, polychlorierte Biphenyle und Herbizide. Sie besitzen eine breitgefächerte Fähigkeit zur Biodegradation, man findet sie daher häufig in kontaminierten Habitaten, wo sie in der Lage sind die Schadstoffe als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Als eine weitere Besonderheit besitzen sie auf der äußeren Membran der Zellwand keine Lipopolysaccharide, sondern Glykosphingolipide (The Prokaryotes). Sie wurden bisher in der Phyllosphäre von Tomate, Ulme und Erdbeere gefunden (Tabelle 10). Typ 33 konnte aufgrund der Sequenzhomologie von 99.5 % zu drei *Sphingomonas*-Arten, die alle in der Antarktis gefunden wurden (Busse et al. 2003, AF184221, AF395031), als eine Art der Gattung *Sphingomonas* identifiziert werden, was sich auch im Stammbaum zeigt.

Afipia sp. (Bradyrhizobiaceae), eine weitere Gattung aus der Ordnung der Sphingomonadales wurde von Brenner et al. (1991) als neue Gattung beschrieben, die sechs Arten umfasst. Drei dieser Arten werden als Verursacher einer, von Katzen übertragenen Krankheit beschrieben, die anderen lösen diese Krankheit nicht aus. Kolonien von *Afipia* sind grau-weiß, glänzend und transparent (Holt et al. 1994); die in dieser Arbeit über die 16S rDNA als *Afipia* sp. identifizierte Art (Typ 29) bildet jedoch sonnengelbe Kolonien aus und zeigt zudem im Stammbaum (Abbildung 34) verwandtschaftliche Nähe zur Gattung *Sphingomonas*. Da die Sequenzhomologie nur 97.89 % betrug, die Teilsequenz nur 154 bp lang war und die 16S rDNA-Sequenz in diesem Bereich zu mehr als 50 % hoch konserviert ist, könnte es sich hier auch *Sphingomonas phyllosphaerae* (Rivas et al. 2004) handeln, mit dessen 16S rDNA dieses Isolat 97.18 % Übereinstimmung zeigte; diese Vermutung wird durch den Stammbaum gestützt.

Caulobacter sp. aus der Familie der Caulobacteraceae sind aerob und chemoorganotroph. Sie kommen in zwei Stadien vor, als schwärmende Organismen und als sessile Organismen, die mit einem Cytoplasma gefüllten Stiel auf Teilchen, Pflanzenmaterial oder anderen Mikroorganismen in wässrigen Habitaten befestigt sind; die Stiele mehrerer Bakterien bilden häufig Rosetten (Madigan et al. 2000). Aus der Familie der Caulobacteraceae wurde bisher nur *Bevundimonas vesicularis* in der Phyllosphäre von *Tilandsia* beschrieben (Tabelle 10). Typ 12 konnte anhand des Stammbaumes (Abbildung 34) als *Caulobacter fusiformis* identifiziert werden, Typ 32 zeigte 98.29 % Sequenzhomologie zu *Caulobacter leidyia* (Tabelle 8), welches sich im Stammbaum im Cluster der Gattung *Sphingomonas* befindet. In einer phylogenetischen Untersuchung zu *Caulobacter* konnte von Sly et al. (1999) gezeigt werden, dass *C. leidyia* nicht direkt mit den anderen *Caulobacter*-Arten verwandt ist, sondern mit den Gattungen *Asticcacaulis* und *Sphingomonas*.

Methylobacterium sp. aus der Familie der Methylobacteriaceae gehören der Ordnung der Rhizobiales an. Sie sind strikt aerob, chemoorganotroph, fakultativ methyлотroph und z. T. fakultativ methanotroph. Sie wurden bisher von vielen Quellen isoliert (Erde, Staub, Luft, Süßwasser, See-Sediment, Blattoberflächen, Reiskörnern, und Krankenhäusern). Auf Methanol-Salzagar bilden die Kolonien eine pinkfarbene Pigmentierung (Holt et al. 1994). Auf Pflanzen sind sie ubiquitär (Hirano & Upper 1991). Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass sie durch die Produktion von Cytokinin die Keimungsrate von Samen und das Pflanzenwachstum positiv beeinflussen (Romanovskaya et al. 2001, Kalyaeva et al. 2001, Trotsenko et al. 2001, Holland et al. 2002, Hornschuh et al. 2002), was zur Entwicklung von patentierten Pflanzenbehandlungsmethoden mit den Arten *M. extorquens*, *M. mesophilicum* und *M. organophilum* führte (Polacco et al. 1993, Joshi & Holland 1999, Holland & Polacco 2000). Typ 30 zeigte nur 96.62 % Übereinstimmung mit der Sequenz von *M. fujisawaense* (Tabelle 8) und anderen Methylobakterien, daher ist eine sichere Zuordnung auf Artebene nicht möglich. Typ 31 hatte eine Sequenzhomologie 99.69 % von zu verschiedenen *Methylobacterium*-Arten, welche von Belüftungssystemen (Hugenholtz & Fuerst 1992), der Rhizosphäre von *Medicago sativa* (AJ250801) und verschiedenen anderen Habitaten (Hiraishi et al. 1995) isoliert wurden. Im Stammbaum befinden sich beide Isolate auf einem Ast, allerdings nicht zusammen mit den Methylobakterien (Abbildung 34). Bei beiden Isolaten ist eine Zuordnung nur auf Gattungsebene möglich.

β-Proteobacteria

Aus der Abteilung der β-Proteobacteria wurden drei Stämme isoliert. Der Gattung *Burkholderia* wurden zwei Isolate zugeordnet. Ein Isolat konnte nicht näher zugeordnet werden.

Die Gattung *Burkholderia* (Burkholderiaceae) aus der Ordnung der Burkholderiales umfasst zum einen Organismen, die Krankheiten bei Menschen, Tieren und Pflanzen verursachen können, zum anderen aber auch Organismen, die das Pflanzenwachstum fördern und antifungale bzw. antinematodale Eigenschaften besitzen. Sie können eine Vielzahl von Substraten metabolisieren und eignen sich daher für den biologischen Schadstoffabbau in kontaminierten Böden (The Prokaryotes). *Burkholderia* wurden in kontaminiertem Gewässern und Böden, natürlichen Böden und der Rhizosphäre von Pflanzen gefunden (Lim et al. 2003). Sie wurden bereits in der Phyllosphäre von Banane, *Tilandsia*, Ananas und Mango beschrieben (Tabelle 10). Die Sequenzanalyse von Typ 34 ergab eine gleich hohe Homologie zu drei *Burkholderia*-Sequenzen (Tabelle 8); *Burkholderia* sp. CD9 wurde aus der Rhizosphäre von *Cyclopia* spp. isoliert (AY178076), die beiden anderen Sequenzen stammen von einer neuen *Burkholderia*-Art, die von einem Faulpilz isoliert wurde (Lim et al. 2003). Im Stammbaum (Abbildung 34) findet man Typ 34 jedoch nicht in der Nähe der *Burkholderia*, sondern auf einem Ast mit Typ 28, und zusammen mit Typ 13 und 14 bilden sie ein

Cluster. Aufgrund der Nähe zu Typ 34 handelt es sich bei Typ 28 vermutlich auch um eine Art der Gattung *Burkholderia*. Typ 27 befindet sich im Stammbaum in Cluster der β -Proteobacteria, dieses wurde durch die Sequenzanalyse bestätigt (Tabelle 8). Eine nähere Zuordnung ist wegen der geringen Länge der Sequenz nicht möglich.

γ -Proteobacteria

Der Abteilung der γ -Proteobacteria konnten 18 Isolate zugeordnet werden. Aus der Gattung *Xanthomonas* wurden 2 Isolate identifiziert, *Pseudomonas* 7 Isolate, *Acinetobacter* 1 Isolat, *Enterobacter* 1 Isolat, *Erwinia* 4 Isolate und *Pantoea* 3 Isolate.

Die Gattung *Xanthomonas* (Xanthomonadaceae) aus der Ordnung der Xanthomonadales wird von einer Gruppe von Phytopathogenen gebildet, die bei einer große Vielfalt an Wirten Krankheiten verursachen. Xanthomonaden sind aerob, chemoorganotroph und in der Lage eine Vielzahl an verschiedenen Kohlenstoffquellen sowie Salze von organischen Säuren als alleinige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Die Kolonien sind für gewöhnlich gelb, bedingt durch die Pigmente, so genannte Xanthomonadine, die typisch für *Xanthomonas* sind (Holt et al. 1994, The Prokaryotes). Verschiedene Xanthomonaden wurden auch auf gesund erscheinenden Pflanzen wie Olive, Kartoffel, Erdbeere, Erdnuss Tomate, Mango und englisches Raigras beschrieben (Tabelle 10). Die Sequenzhomologie von Typ 2 mit einem *X. gardneri*-Stamm betrug 99.47 %, im Stammbaum befanden sie sich jedoch nicht auf einem Ast (Abbildung 33). Typ 1, der sich im Stammbaum mit Typ 2 und Typ 7 auf einem Ast befindet, wurde den Xanthomonaden zugeordnet, da er im Gegensatz zu Typ 7 und genauso wie Typ 2 gelb pigmentiert ist. Für Typ 1 ist eine sichere Zuordnung nur auf Ebene der γ -Proteobacteria möglich.

Die Gattung *Pseudomonas* (Pseudomonadaceae) aus der Ordnung der Pseudomonadales umfasst eine Vielzahl von Arten, die einen großen Anteil der Mikroflora im Boden, Süß- und Salzwasser und anderen natürlichen Habitaten bilden. Sie sind sowohl als Saprophyten, aber auch als Krankheitserreger für Menschen, Tiere und Pflanzen bekannt. Sie kommen in der Regel ubiquitär vor und stellen wenige Ansprüche bezüglich des Substrates (Holt et al 1994, The Prokaryotes). Bisher wurden sehr viele *Pseudomonas*-Arten in der Phyllosphäre von Pflanzen beschrieben (Tabelle 10), dies beruht sehr wahrscheinlich auf der Tatsache, dass sich *Pseudomonas* einfach zu kultivieren sind, während andere Arten anderer Familien nicht oder nur sehr schwer mit Spezialmedien zu kultivieren sind. In den letzten Jahren wurden vermehrt neue Arten eingeführt, die nur in Assoziation mit Pflanzen entdeckt wurden und nicht-pathogen sind (z. B. *P. graminis*, *P. rhizosphaerae*, *P. lutea*, *P. congelans*, *P. tivialis*, *P. poa*). Für alle Pseudomonaden wurden die Ergebnisse der Sequenzanalyse durch die Position im Stammbaum gestützt (Tabelle 8, Abbildung 33). Bezüglich des Stammbaumes ist für das *Pseudomonas*-Cluster auffällig, dass die Fragmentmuster der

Sequenzen aus der Literatur und die Arten aus dieser Arbeit sich im Stammbaum nicht mischen, sondern auf getrennten Ästen erscheinen. Auf diese Problematik wird in einem späteren Abschnitt näher eingegangen (3.3.2). Die Typen 15 – 17 bilden im *Pseudomonas*-Cluster einen eigenen Ast und scheinen sehr nah miteinander verwandt zu sein. Dies wird auch durch die Sequenzanalyse deutlich. Bei den drei Stämmen sind die ersten vier der besten Treffer identisch, nur die Reihenfolge wechselt. Die Sequenzhomologien sind z. T. nicht sehr hoch (z. B. 96.51 % für Typ 17), daher ist Zutreffen der Sequenzanalyse relativ unwahrscheinlich. Bei den Typen 15 - 17 handelt es sich wahrscheinlich um nahe Verwandte zu *P. rhizosphaerae*. *P. rhizosphaerae*, ein naher Verwandter zu *P. graminis* wurde ebenfalls von Gräsern isoliert und von Peix et al. (2003) als neue Art beschrieben. *P. rhizosphaerae* kann im Gegensatz zu *P. graminis* Phosphor solubilisieren, und Erythriol und Rhamnose metabolisieren. Die Sequenzen der Typen 10 und 26 zeigten hohe Übereinstimmungen mit Pathovaren von *P. syringae* (Tabelle 8). Bei Typ 25 handelt es sich wahrscheinlich ebenfalls um ein Pathogen. Es liegt im Stammbaum auf einem Ast mit Typ 26 und es wurde ausschließlich auf Blatt 2 (P3) mit einer sehr hohen Zellzahl von 10^{11} CFU cm⁻² gefunden. Typ 11 hatte 99.84 % Sequenzübereinstimmungen mit mehreren *Pseudomonas*-Arten, von denen *P. trivialis* und *P. poae* von Gräsern isoliert wurden (Behrendt et al. 2003).

Die Gattung *Acinetobacter* (Moraxellaceae) aus der Ordnung der Pseudomonadales ist als Saprophyt ubiquitär in Boden, Wasser und Abwasser, und Nahrungsmitteln zu finden. Im klinischen Bereich ist *Acinetobacter* ebenfalls ubiquitär und wird zunehmend als Verursacher nosocomialer Erkrankungen entdeckt, da sie rasch Resistenzen gegen Antibiotika zu entwickeln vermögen. Sie sind strikt aerob und wachsen sowohl auf komplexen Medien, als auch auf Medien mit nur einer Kohlenstoffquelle (The Prokaryotes). *Acinetobacter* wurden bisher in der Phyllosphäre von *Citrus*, Kartoffel, Tomate und englischem Raigras beschrieben (Tabelle 10). Die Sequenzhomologie von Typ 24 betrug mit verschiedenen *Acinetobacter*-Arten 100 %, daher ist eine Zuordnung nur auf Gattungsebene möglich. Die Position im Stammbaum (Abbildung 33) stützt diese Zuordnung, wenn auch nicht stark.

Arten der Gattung *Enterobacter* (Enterobacteriaceae) aus der Ordnung der Enterobacteriales sind fakultativ anaerob und chemoorganotroph. Sie sind weit verbreitet und kommen in Trinkwasser, Böden, Abwässern, Pflanzen, Früchten sowie tierischen und menschlichen Exkrementen vor. Viele Arten verursachen Erkrankungen (z. B. nosocomiale Erkrankungen im Urinalbereich) (Holt et al. 1994, The Prokaryotes). In der Literatur wurden *Enterobacter*-Arten in der Phyllosphäre von Erdbeere, Erdnuss, *Citrus* und Steineiche beschrieben (Tabelle 10). Typ 9 wurde aufgrund der Sequenzhomologie als *E. asburiae* identifiziert. Im Stammbaum lässt sich diese genaue Zuordnung nicht treffen, da die verschiedenen Arten der Gattungen *Enterobacter*, *Erwinia* und *Pantoea* keine distinkten Cluster bilden (Abbildung 33).

Mitglieder der Gattung *Erwinia* (Enterobacteriaceae) aus der Ordnung der Enterobacteriales sind vorwiegend fakultativ anaerobe, chemoorganotrophe Pflanzenpathogene oder pflanzenassoziierte Bakterien (The Prokaryotes). Bei Untersuchungen an gesunden Pflanzen wurden sie auf Kartoffel, Tomate Gurke, *Citrus*, Birne, Apfel, Banane, Olive, Ulme und *Tilandsia* gefunden (Tabelle 10). Die Typen 5 und 8, die im Stammbaum deutlich eine Verwandtschaft erkennen lassen (Abbildung 33) besaßen große Sequenzübereinstimmungen mit *Erwinia billingiae* (Tabelle 8). Verschiedene *Erwinia*-Stämme, die über Jahre hinweg von Sträuchern und Bäumen isoliert worden waren, wurden von Mergaert et al. (1999) als neue Art *E. billingiae* klassifiziert. Obwohl sie vornehmlich von kranken Pflanzenteilen in Assoziation mit Phytophathogenen isoliert wurden, wird *E. billingiae* nicht als Primärpathogen beschrieben. Bei beiden Isolaten handelt es sich vermutlich um zwei verschiedene Arten, da die Verdauemuster sich in einem Merkmal unterschieden (Abbildung 54). Typ 7 zeigte 100 % Sequenzübereinstimmung mit *E. persicinus*, aber auch mit *E. rhapontici* und *Pantoea toletana*. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei der kurzen Teilsequenz um einen innerhalb der Enterobacteriaceae hoch konservierten Bereich handelt. Insofern ist die Sequenzanalyse in diesem Fall wenig aussagekräftig; gleiches gilt für Typ 23. Die Verdauemuster von Typ 7 und 23 unterschieden sich sowohl untereinander, als auch von *E. persicinus*. Ein weiteres Indiz ist, dass *E. persicinus* ein rosafarbenes Pigment produziert (Hao et al. 1990), während Typ 7 und 25 unpigmentiert sind.

Die Gattung *Pantoea* (Enterobacteriaceae) aus der Ordnung der Enterobacteriales wurde 1989 aus nahe verwandten Arten gebildet, die zuvor in verschiedenen Gattungen (z. B. *Enterobacter* und *Erwinia*) angesiedelt waren. Sie sind fakultativ anaerob und chemoorganotroph; es kommen sowohl gelb pigmentierte, als auch unpigmentierte Arten vor. Die Mitglieder der Gattung *Pantoea* sind in der Natur weit verbreitet. Sie wurden in Assoziation mit Pflanzen, Menschen und Tieren, im Boden, Wasser, auf Pflanzenoberflächen, Samen und Früchten gefunden (Holt et al. 1994, The Prokaryotes). Sie wurden bereits in der Phyllosphäre von vielen Pflanzen beschrieben (Tabelle 10). Die Typen 4 und 6 zeigten beide hohe Sequenzhomologie zu einem Stamm, der in einer Studie über Endophyten in Pflanzen isoliert wurde (Tabelle 8). Die Verdauemuster unterschieden sich jedoch stark voneinander; die gleiche Aussage lässt sich auch für Typ 3 treffen.

Insgesamt ist die phylogenetische Einordnung der Enterobacteriaceae relativ schwer, da die Gattungen untereinander eng miteinander verwandt sind. Die Zuordnung über ARDRA ist nur auf Familienebene möglich, hier bilden sie allerdings ein deutliches Cluster (Abbildung 33). Erst die Sequenzanalyse ermöglicht eine Zuordnung auf Gattungsebene, dabei sollte die Sequenz möglichst lange sein bzw. die hochvariablen Bereiche der 16S rDNA abdecken.

Gram-positive Arten mit niedrigem GC-Gehalt

Aus der Abteilung der der Gram-positiven Arten mit niedrigem GC-Gehalt wurden drei Stämme isoliert. Der Gattungen *Bacillus* wurden zwei Isolate zugeordnet. Ein Isolat konnte nicht näher zugeordnet werden.

Firmicutes – Sektion Bacilli und Lactobacilli

Arten der Gattung *Bacillus* (Bacillaceae) aus der Ordnung der Bacillales sind aerob oder fakultativ anaerob und chemoorganotroph. Bacillaceae unterscheiden sich von anderen Familien durch die Produktion von Endosporen. Sie sind in vielen verschiedenen Habitaten anzutreffen (Wasser Böden, Nahrungsmittel, Exkremente, Pflanzenmaterial, Seesediment, heiße Quellen). Einige Arten sind Insektenpathogene (*B. thuringiensis*, *B. larvae*) bzw. Humanpathogene (*B. anthracis*, *B. cereus*). (Holt et al. 1994, Madigan et al. 2000, The Prokaryotes). Sie wurden bisher in der Phyllosphäre von vielen Arten beschrieben (Tabelle 10). Die Typen 13 und 14 zeigten sehr hohe Sequenzhomologien zu *B. fusiformis* bzw. *B. pumilus*, sie sind in Stammbaum auch in relativer Nähe zueinander zu finden, jedoch nicht im Cluster der *Bacillus*-Arten. Die Verdauungsmuster zeigten ebenfalls wenig Übereinstimmung. Eine Zuordnung auf Artebene ist mit den verfügbaren Daten nicht möglich.

Von Typ 19 wurde keine Sequenz erhalten, im Stammbaum befindet er sich im Bereich der Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt. Eine genauere Zuordnung ist nicht möglich.

Gram-positive Arten mit hohem GC-Gehalt

Firmicutes – Sektion Actinobacteria

Aus der Abteilung der der Gram-positiven Arten mit hohem GC-Gehalt wurden vermutlich zwei Stämme isoliert.

Aus der Sektion der Actinobacteria wurden bereits einige Arten in der Phyllosphäre beschrieben (Tabelle 10). Die Typen 18 und 22, von denen keine Sequenzierung möglich war, befinden sich im Stammbaum in direkter Nähe zu *Clavibacter michiganensis* aus der Familie der Microbacteriaceae (Ordnung Actinomycetales), einem Phytopathogen (Holt et al. 1994). Da die Verdauungsmuster der Isolate sich jedoch deutlich von dem von *C. michiganensis* unterscheiden, sollte die Identität der Isolate weiter überprüft werden. Eine Zuordnung auf Familienebene scheint jedoch zulässig.

Von *Juglans regia* L. konnte ein breites Spektrum an Bakterien isoliert werden, die zum Großteil bereits als pflanzliche Epiphyten beschrieben waren (Tabelle 10). Viele diese Arten insbesondere aus den Gattungen *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Burkholderia* und *Sphingomonas* sind in der Lage ein breites Spektrum an Nährstoffquellen zu nutzen. Speziell *Burkholderia* und *Sphingomonas* können natürliche und technische organische Verbindungen abbauen; vermutlich existieren Stämme, die sich auf den Abbau von Wachs- und Kutinbausteinen spezialisiert haben. Die Fähigkeit würde ihnen einen evolutionären Vorteil gegenüber anderen Phyllosphärenbakterien verschaffen. Aus der Gattung *Pseudomonas* ist bereits eine Art bekannt, die eine Kutinase synthetisiert (Sebastian et al. 1987). Häufig werden auch auf gesunden Pflanzenteilen Phytopathogene gefunden, die in geringen Populationsdichten keine Krankheiten verursachen, sondern als Saprophyten auf der Pflanze leben. Phytopathogene sind aus beinahe allen, von *Juglans* isolierten Gattungen bekannt, bei den Typen 2, 4, 18, 22, 25, 26 und 28 handelt es sich vermutlich um Phytopathogene. Einige der Arten, die in der Phyllosphäre gefunden werden, sind Humanpathogene (z. B. aus den Gattungen *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*). Das Überleben von Humanpathogenen in der Phyllosphäre ist ein wichtiger Aspekt bei der Herstellung von pflanzlichen Nahrungsmitteln. Besonders bei Frischprodukten spielt die Anzahl der Pathogene und ihre Fähigkeit sich während Transport und Lagerung zu vermehren eine wichtige Rolle. Aus der Gattung *Bacillus* sind Insektenpathogene bekannt, eine Besiedlung der Pflanze mit einem solchen Pathogen könnte für die Pflanze einen selektiven Vorteil bedeuten, falls infizierte Pflanzenschädlinge absterben, bevor sie die Pflanze schädigen können. Aus der Gattung *Burkholderia* gibt es Arten mit antifungaler bzw. antinematodaler Wirkung, deren Wachstum schützt somit die Pflanze vor Pilz- und Nematodenbefall. Der Vorteil aus Sicht der Bakterien im Falle der antifungalen Wirkung besteht darin, dass sie nicht mit den Pilzen um Nährstoffe konkurrieren müssen. Mit zunehmender Verbesserung der Methoden der Kultivierung und Identifikation bzw. der Identifikation von Bakterien ohne Kultivierung hat die Beschreibung neuer Arten drastisch zugenommen (Forney et al. 2004). Auch aus der Gattung *Pseudomonas* wurden zunehmend neue Arten gefunden, die mit Pflanzen assoziiert waren, allerdings ist es nicht auszuschließen, dass viele dieser Arten schon früher gefunden wurden, jedoch nicht als eigene Art erkannt wurden. Isolate aus früheren Arbeiten werden in der Regel nicht reklassifiziert und sind daher vermutlich unter falschen Artnamen in Datenbanken und Veröffentlichungen zu finden. Vergleicht man das Artenspektrum aus Tabelle 10 mit den Arten, die in dieser Arbeit bestimmt wurden, so lässt sich erkennen, dass relativ wenige Gram-positive Arten bestimmt wurden. Dies kann zwei Ursachen haben; (I) es kamen nur so wenige Gram-positive Arten vor; (II) sie sind unter den Arten, die noch nicht bestimmt werden konnten. Generell ist bei der Untersuchung komplexer mikrobieller Gemeinschaften zu bedenken, man nur jene Arten erforschen und bestimmen kann, welche mit den angewandten Methoden untersucht werden können.

Tabelle 10 Übersicht über bisher von Pflanzen isolierte Bakterien

Die Namen der einzelnen Arten wurden, falls nötig entsprechend den Angaben bei NCBI korrigiert. Die systematische Einordnung erfolgte nach Angaben von NCBI und in Brock – Biology of Microorganisms (9. Edition, Madigan et al. 2000). Arten, die in dieser Arbeit isoliert wurden, sind fett gedruckt.

	Art	Ursprung	Literaturquelle	
Gram-negative				
α-Proteobacteria				
Rhodospirillales				
Acetobacteriaceae	<i>Acetobacter aceti</i>	<i>Olera europaea</i>	Ercolani 1990	
	<i>Gluconobacter oxydans</i>	<i>Olera europaea</i>	Ercolani 1990	
	<i>Gluconobacter</i> sp.	Mango	de Jager et al. 2001	
Rhodobacterales				
Rhodobacteraceae	<i>Rhodobacter</i> sp.	<i>Arachis hypogaeae</i>	Sundin & Jacobs 1999	
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000	
Sphingomonadales				
Spingomonadaceae	<i>Novosphingobium capsulalum</i>	Reis	Pati & Chandra 1993	
	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Tilandsia</i> sp.	Brighigna et al. 2000	
	<i>Sphingomonas phyllosphaerae</i>	<i>Acacia caven</i>	Rivas et al. 2004	
	<i>Sphingomonas</i> sp.	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000	
		<i>Ulmus</i> sp.	Mocali et al. 2003	
		<i>Fragaria ananassa</i>	eigene Daten, unveröffentlicht diese Arbeit	
		<i>Juglans regia</i>		
	<i>Zymomonas mobilis</i>	<i>Olera europaea</i>	Ercolani 1990	
	Beijerinckiaceae	<i>Beijerinckia</i> sp.	Jute	Pati & Chandra 1993
	Bradyrhizobiaceae	<i>Afipia</i> sp.	<i>Juglans regia</i>	diese Arbeit
Caulobacterales				
Caulobacteraceae	<i>Caulobacter fusiformis.</i>	<i>Juglans regia</i>	diese Arbeit	
	<i>Caulobacter leidyia.</i>	<i>Juglans regia</i>	diese Arbeit	
	<i>Bevundimonas vesicularis</i>	<i>Tilandsia</i> sp.	Brighigna et al. 2000	
Rhizobiales				
Rhizobiaceae	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Tilandsia</i> sp.	Brighigna et al. 2000	
	<i>Agrobacterium</i> sp.	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer et al. 1999	
Brucellaceae	<i>Ochrobactrum</i> sp.	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000	
Methylobacteriaceae	<i>Methylobacterium extorquens</i>	<i>Cactus</i> sp.	Romanovskaya et al. 2001	
		<i>Trifolium pratense</i>		
		<i>Vitis omerensis</i>		
	<i>Methylobacterium mesophilum</i>	<i>Trifolium pratense</i>	Romanovskaya et al. 2001	
		<i>Chelidonium</i> sp.		
	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	<i>Vitis omerensis</i>	Romanovskaya et al. 2001	
		<i>Juglans regia</i>	diese Arbeit	
	<i>Methylobacterium</i> sp.	<i>Populus pyramidalis</i>	Romanovskaya et al. 2001	
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000	
		<i>Funaria hygrometrica</i>	Hornschuh et al. 2002	
		<i>Rubus</i> sp.	eigene Daten, unveröffentlicht	
		<i>Fragaria ananassa</i>		
		<i>Hedera helix</i>	diese Arbeit	
		<i>Juglans regia</i>		

	Art	Ursprung	Literaturquelle	
β-Proteobacteria				
Burkholderiales				
Burkholderiaceae	<i>Burkholderia brasiliensis</i>	<i>Musa</i> sp.	Magalhães Cruz et al. 2001	
	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Tilandsia</i> sp.	Brighigna et al. 2000	
	<i>Burkholderia sordidicola</i>	<i>Phanerochaete sordida</i>	Lim et al. 2003	
	<i>Burkholderia tropica</i>	<i>Ananas comosus</i>	Magalhães Cruz et al. 2001	
	<i>Burkholderia</i> sp.	Mango <i>Juglans regia</i>	de Jager et al. 2001 diese Arbeit	
Oxalobacteraceae	<i>Herbaspirillum rubisubalbicans</i>	<i>Musa</i> sp. <i>Ananas comosus</i>	Magalhães Cruz et al. 2001	
	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	<i>Musa</i> sp.	Magalhães Cruz et al. 2001	
	<i>Janthinobacterium lividum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer et al. 1999	
Alcanigenaceae	<i>Achromobacter</i> sp.	<i>Hedera helix</i>	Schreiber et al. 2005	
	<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Olera europaea</i>	Ercolani 1990	
	<i>Alcaligenes</i> sp.	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000	
Comamonadaceae	<i>Acidovorax</i> sp.	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000	
	<i>Comamonas</i> sp.	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer et al. 1999	
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000 Dianese et al. 2003	
		<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer et al. 1999	
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000	
γ-Proteobacteria				
Xanthomonadales				
Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer & Smalla 1997 Heuer et al. 1999	
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000 Dianese et al. 2003	
		<i>Fragaria ananassa</i>	Krimm 2001	
		<i>Ulmus</i> sp.	Mocali et al. 2003	
		<i>Fagus sylvatica</i>	Müller et al. 2003	
		<i>Quercus petraea</i>		
		<i>Hedera helix</i>	Schreiber et al. 2005	
		<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>Olera europaea</i>	Ercolani 1990
		<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer & Smalla 1997	
		<i>Fragaria ananassa</i>	Tanprasert & Reed 1998	
		<i>Lolium perenne</i>	Hirano & Upper 2000	
		<i>Xanthomonas</i> sp.	<i>Fragaria ananassa</i>	Tanprasert & Reed 1998
		<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer et al. 1999	
		<i>Arachis hypogaeae</i>	Sundin & Jacobs 1999	
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000 Dianese et al. 2003	
			Mango <i>Juglans regia</i>	de Jager et al. 2001 diese Arbeit
	Pseudomonadales			
Pseudomonadaceae	<i>Azomonas macrocytogenes.</i>	Jute	Pati & Chandra 1993	
	<i>Azotobacter chroococcum</i>	Reis	Pati & Chandra 1993	
	<i>Chryseomonas</i> sp.	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000	
	<i>Flavimonas</i> sp.	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer & Smalla 1997	
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000	

	Art	Ursprung	Literaturquelle
P.aeruginosa-Gruppe	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Olera europaea</i>	Ercolani 1990
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer et al. 1999
	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	<i>Citrus sinensis</i>	Yang et al. 2000
P. chlororaphis- Gruppe	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Legard et a. 1994
		<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer & Smalla 1997
		<i>Beta vulgaris</i>	Ellis et al. 1999
P. fluorescens-Gruppe	<i>Pseudomonas fragii</i>	<i>Brassica oleracea Italica</i>	Padaga et al. 2000
	<i>Pseudomonas congelans</i>	Gras	Behrendt et al. 2003
	<i>Pseudomonas corrugata</i>	<i>Fragaria ananassa</i>	Tanprasert & Reed 1998
		<i>Brassica oleracea Italica</i>	Padaga et al. 2000
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Olera europaea</i>	Ercolani 1990
		<i>Triticum aestivum</i>	Legard et al. 1994
		<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer & Smalla 1997
		<i>Cichorium endivia</i> var. <i>latifolia</i>	Morris et al. 1998
		<i>Fragaria ananassa</i>	Tanprasert & Reed 1998
		<i>Beta vulgaris</i>	Ellis et al. 1999
		<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer et al. 1999
		<i>Malus x domestica</i>	Kucheryava et al. 1999
		<i>Lolium perenne</i>	Hirano & Upper 2000
		<i>Brassica oleracea Italica</i>	Padaga et al. 2000
		<i>Fagus sylvatica</i>	Müller et al. 2003
		<i>Quercus petraea</i>	
		<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer & Smalla 1997
		<i>Beta vulgaris</i>	Ellis et al. 1999
	<i>Pseudomonas orientalis</i>	<i>Fragaria ananassa</i>	Krimm 2001
	<i>Pseudomonas poae</i>	Gras	Behrendt et al. 2003
	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	<i>Fragaria ananassa</i>	Tanprasert & Reed 1998
	<i>Pseudomonas trivialis</i>	Gras	Behrendt et al. 2003
	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Phaseolus mungo</i>	Sebastian et al. 1987
		<i>Triticum aestivum</i>	Legard et al. 1994
		<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer & Smalla 1997
		<i>Malus x domestica</i>	Kucheryava et al. 1999
		<i>Cichorium endivia</i> var. <i>latifolia</i>	Morris et al. 1998
		<i>Beta vulgaris</i>	Ellis et al. 1999
		<i>Citrus sinensis</i>	Yang et al. 2000
P. syringae-Gruppe	<i>Pseudomonas cichorii</i>	<i>Arachis hypogaeae</i>	Jacobs & Sundin 2001
		<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer & Smalla 1997
		<i>Beta vulgaris</i>	Ellis et al. 1999
	<i>Pseudomonas savastanoi</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer et al. 1999
		<i>Beta vulgaris</i>	Ellis et al. 1999
		<i>Olera europaea</i>	Ercolani 1990
	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer & Smalla 1997
		<i>Beta vulgaris</i>	Ellis et al. 1999
		<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer et al. 1999
		<i>Malus x domestica</i>	Kucheryava et al. 1999
		<i>Fagus sylvatica</i>	Müller et al. 2003
		<i>Quercus petraea</i>	
		<i>Hedera helix</i>	Schreiber et al. 2005
		<i>Juglans regia</i>	diese Arbeit

	Art	Ursprung	Literaturquelle
	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	<i>Beta vulgaris</i>	Ellis et al. 1999
		<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer et al. 1999
		<i>Brassica oleracea Italica</i>	Padaga et al. 2000
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer et al. 1999
	<i>Pseudomonas luteola</i>	<i>Tilandsia</i> sp.	Brighigna et al. 2000
	<i>Pseudomonas graminis</i>	Gras	Behrendt et al. 1999
		<i>Fagus sylvatica</i>	Müller et al. 2003
		<i>Quercus petraea</i>	
		<i>Hedera helix</i>	Schreiber et al. 2005
	<i>Pseudomonas lurida</i>	<i>Fragaria ananassa</i>	Krimm 2001
	<i>Pseudomonas lutea</i>	Gras (Rhizosphäre)	Peix et al. 2004
	<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	<i>Fragaria ananassa</i>	Krimm 2001
		Gras	Peix et al. 2003
		<i>Juglans regia</i>	diese Arbeit
	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer & Smalla 1997
		<i>Arachis hypogaeae</i>	Sundin & Jacobs 1999
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000
			Dianese et al. 2003
		<i>Lolium perenne</i>	Hirano & Upper 2000
		<i>Alfalfa</i>	Stromberg et al. 2000
		Rotklee	
		<i>Triticum aestivum</i>	
		Lamiaceae	
		Poaceae	
		Mango	de Jager et al. 2001
		<i>Fragaria ananassa</i>	Krimm 2001
		<i>Hedera helix</i>	Schreiber et al. 2005
		<i>Juglans regia</i>	diese Arbeit
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	<i>Citrus sinensis</i>	Yang et al. 2000
	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	<i>Juglans regia</i>	diese Arbeit
	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer & Smalla 1997
			Heuer et al. 1999
		<i>Lolium perenne</i>	Hirano & Upper 2000
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000
		<i>Citrus sinensis</i>	Yang et al. 2000
	<i>Psychrobacter</i> sp.	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000
Vibrionales			
Vibrionaceae	<i>Photobacterium</i> sp.	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer et al. 1999
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000
Aeromocadales			
Aeromonadaceae	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Tilandsia</i> sp.	Brighigna et al. 2000
Enterobacteriales			
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter asburiae</i>	<i>Citrus sinensis</i>	Yang et al. 2000
		<i>Juglans regia</i>	diese Arbeit
	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Fragaria ananassa</i>	Tanprasert & Reed 1998
		<i>Quercus petraea</i>	Müller et al. 2003
	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Fragaria ananassa</i>	Tanprasert & Reed 1998
		<i>Arachis hypogaeae</i>	Sundin & Jacobs 1999
		Mango	de Jager et al. 2001
	<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer & Smalla 1997
		<i>Citrus sinensis</i>	Yang et al. 2000

Art	Ursprung	Literaturquelle
<i>Erwinia billingiae</i>	<i>Pyrus communis</i> , <i>P. avium</i> <i>Crataegus laevigata</i> <i>Malus sylvestris</i> <i>Ulmus</i> sp. <i>Juglans regia</i>	Mergaert et al. 1999 diese Arbeit
<i>Erwinia persicinus</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i> <i>Musa</i> sp. Gurke <i>Juglans regia</i>	Hao et al. 1990 diese Arbeit
<i>Erwinia rhapontici</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer & Smalla 1997 Heuer et al. 1999
<i>Erwinia</i> sp.	<i>Citrus sinensis</i> <i>Olera europaea</i> <i>Tilandsia</i> sp. <i>Lycopersicon esculentum</i>	Yang et al. 2000 Ercolani 1990 Brighigna et al. 2000 Dianese et al. 2003
<i>Escherichia vulneris</i>	<i>Fagus sylvatica</i> <i>Quercus petraea</i>	Müller et al. 2003
<i>Escherichia</i> sp.	<i>Arachis hypogaeae</i>	Sundin & Jacobs 1999
<i>Hafnia alvei</i>	<i>Solanum tuberosum</i> <i>Cichorium endivia</i> var. <i>latifolia</i> <i>Fagus sylvatica</i>	Heuer & Smalla 1997 Morris et al. 1998 Müller et al. 2003
<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Lolium perenne</i> Mango <i>Fagus sylvatica</i> <i>Quercus petraea</i>	Hirano & Upper 2000 de Jager et al. 2001 Müller et al. 2003
<i>Morganella morganii</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer & Smalla 1997
<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Olera europaea</i> <i>Triticum aestivum</i> <i>Solanum tuberosum</i> <i>Malus x domestica</i> <i>Tilandsia</i> sp. <i>Lolium perenne</i> <i>Brassica oleracea</i> Italica <i>Citrus sinsensis</i> <i>Arachis hypogaeae</i> <i>Ulmus</i> sp. <i>Fagus sylvatica</i> <i>Quercus petraea</i> <i>Juglans regia</i>	Ercolani 1990 Legard et al. 1994 Heuer & Smalla 1997 Heuer et al. 1999 Kucheryava et al. 1999 Brighigna et al. 2000 Hirano & Upper 2000 Padaga et al. 2000 Yang et al. 2000 Jacobs & Sundin 2001 Mocali et al. 2003 Müller et al. 2003 diese Arbeit
<i>Pantoea ananatis</i>	<i>Arachis hypogaeae</i>	Jacobs & Sundin 2001
<i>Pantoea</i> sp.	<i>Arachis hypogaeae</i> <i>Lycopersicon esculentum</i> Mango	Sundin & Jacobs 1999 Jurkevitch & Shapira 2000 Dianese et al. 2003 de Jager et al. 2001
<i>Pectobacterium carotovora</i>	<i>Olera europaea</i>	Ercolani 1990
<i>Providencia</i> sp.	Mango	de Jager et al. 2001
<i>Rahnella aquatilis</i>	<i>Tilandsia</i> sp. <i>Fagus sylvatica</i> <i>Quercus petraea</i>	Brighigna et al. 2000 Müller et al. 2003
<i>Raoultella planticola</i>	<i>Olera europaea</i>	Ercolani 1990

	Art	Ursprung	Literaturquelle
	<i>Serratia fonticola</i>	<i>Fagus sylvatica</i>	Müller et al. 2003
	<i>Serratia grimesii</i>	<i>Fagus sylvatica</i>	Müller et al. 2003
	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer & Smalla 1997
		<i>Tilandsia</i> sp.	Brighigna et al. 2000
		<i>Fagus sylvatica</i>	Müller et al. 2003
		<i>Quercus petraea</i>	
	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Olera europaea</i>	Ercolani 1990
		<i>Tilandsia</i> sp.	Brighigna et al. 2000
	<i>Serratia plymuthica</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Legard et al. 1994
	<i>Serratia proteamaculans</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer & Smalla 1997
	<i>Serratia</i> sp.	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer et al. 1999
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	Dianese et al. 2003
		<i>Buxus sempervivens</i>	Schreiber et al. 2005
	<i>Yersinia aldovae</i>	<i>Tilandsia</i> sp.	Brighigna et al. 2000
	<i>Yersinia frederiksenii</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer & Smalla 1997
	<i>Yersinia</i> sp.	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer et al. 1999
Pasteurellales			
Pasteuellaceae			
	<i>Actinobacillus lignieresii</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer & Smalla 1997
	<i>Actinobacillus</i> sp.	<i>Arachis hypogaeae</i>	Sundin & Jacobs 1999
Gram-positive mit niedrigem GC-Gehalt			
Firmicutes - Clostridia			
Clostridiales			
Clostridiaceae			
	<i>Clostridium bifermentans</i>	<i>Citrus sinensis</i>	Yang et al. 2000
Firmicutes - Bacilli			
Bacillales			
Bacillaceae			
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Quercus ilex</i>	Brunel et al. 1994
		<i>Tilandsia</i> sp.	Brighigna et al. 2000
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	Theoduluz et al. 2003
	<i>Bacillus circulans</i>	<i>Tilandsia</i> sp.	Brighigna et al. 2000
	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Arachis hypogaeae</i>	Jacobs & Sundin 2001
	<i>Bacillus firmus</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Theoduluz et al. 2003
	<i>Bacillus fusiformis</i>	<i>Juglans regia</i>	diese Arbeit
	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Tilandsia</i> sp.	Brighigna et al. 2000
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	Theoduluz et al. 2003
	<i>Bacillus macroides</i>	<i>Ulmus</i> sp.	Mocali et al. 2003
	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Olera europaea</i>	Ercolani 1990
		<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer & Smalla 1997
		<i>Arachis hypogaeae</i>	Jacobs & Sundin 2001
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	Theoduluz et al. 2003
	<i>Bacillus mycoides</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer et al. 1999
		<i>Malus x domestica</i>	Kucheryava et al. 1999
	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Quercus ilex</i>	Brunel et al. 1994
		<i>Malus x domestica</i>	Kucheryava et al. 1999
		<i>Tilandsia</i> sp.	Brighigna et al. 2000
		<i>Citrus sinensis</i>	Yang et al. 2000
		<i>Arachis hypogaeae</i>	Jacobs & Sundin 2001
		<i>Juglans regia</i>	diese Arbeit
	<i>Bacillus sphaericus</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer et al. 1999
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	Theoduluz et al. 2003

	Art	Ursprung	Literaturquelle
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Olera europaea</i>	Ercolani 1990
		<i>Tilandsia</i> sp.	Brighigna et al. 2000
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	Theoduluz et al. 2003
	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Olera europaea</i>	Ercolani 1990
		Senf	Pati & Chandra 1993
		<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer & Smalla 1997
		<i>Arachis hypogaeae</i>	Sundin & Jacobs 1999
		<i>Lolium perenne</i>	Hirano & Upper 2000
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000
			Dianese et al. 2003
		Mango	de Jager et al. 2001
		<i>Fragaria ananassa</i>	Krimm 2001
		<i>Ulmus</i> sp.	Mocali et al. 2003
Planococcaceae	<i>Kurthia</i> sp.	<i>Arachis hypogaeae</i>	Sundin & Jacobs 1999
Paenibacillaceae	<i>Brevibacillus brevis</i>	<i>Tilandsia</i> sp.	Brighigna et al. 2000
	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Theoduluz et al. 2003
	<i>Brevibacillus</i> sp.	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000
	<i>Paenibacillus</i> sp.	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer et al. 1999
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000
Lactobacillales			
Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Olera europaea</i>	Ercolani 1990
	<i>Pediococcus</i> sp.	Mango	de Jager et al. 2001
Leuconostocaceae	<i>Leuconostoc mesenteriodes</i> subsp. <i>dextranicum</i>	<i>Olera europaea</i>	Ercolani 1990
	<i>Leuconostoc</i> sp.	Mango	de Jager et al. 2001
	<i>Weissella</i> sp.	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000
Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000
		Mango	de Jager et al. 2001
Enterococcaceae	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Gras	Ott et al. 2001
	<i>Enterococcus faecalis</i>	Gras	Ott et al. 2001
	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Olera europaea</i>	Ercolani 1990
		Gras	Ott et al. 2001
	<i>Enterococcus mundtii</i>	Gras	Ott et al. 2001
	<i>Enterococcus sulfureus</i>	Gras	Ott et al. 2001
Listeriaceae	<i>Brochothrix</i> sp.	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer & Smalla 1997
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000
	<i>Listeria</i> sp.	<i>Lolium perenne</i>	Hirano & Upper 2000
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	<i>Brassica oleracea</i> Italica	Padaga et al. 2000
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Lolium perenne</i>	Hirano & Upper 2000
	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Arachis hypogaeae</i>	Sundin & Jacobs 1999
		<i>Lolium perenne</i>	Hirano & Upper 2000
		Mango	de Jager et al. 2001
		<i>Ulmus</i> sp.	Mocali et al. 2003
Gram-positive mit hohem GC-Gehalt			
Firmicutes - Actinobacteria			
Actinobacteridae			
Actinomycetales			
Micrococcineae			
Micrococcaceae	<i>Arthrobacter globiformis</i>	<i>Olera europaea</i>	Ercolani 1990
		<i>Brassica oleracea</i> Italica	Padaga et al. 2000

	Art	Ursprung	Literaturquelle
	<i>Arthrobacter ilicis</i>	<i>Brassica oleracea Italica</i>	Padaga et al. 2000
	<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer & Smalla 1997 Heuer et al. 1999
		<i>Arachis hypogaeae</i>	Sundin & Jacobs 1999
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000
		<i>Fragaria ananassa</i>	Krimm 2001
		<i>Buxus sempervivens</i>	Schreiber et al. 2005
		<i>Vinca major</i>	
	<i>Kocuria</i> sp.	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer et al. 1999
	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Olera europaea</i>	Ercolani 1990
		<i>Lolium perenne</i>	Hirano & Upper 2000
	<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Olera europaea</i>	Ercolani 1990
		<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer & Smalla 1997
		<i>Arachis hypogaeae</i>	Sundin & Jacobs 1999
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000
		Mango	de Jager et al. 2001
Brevibacteriaceae	<i>Brevibacterium helvolum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer & Smalla 1997
	<i>Brevibacterium</i> sp.	<i>Arachis hypogaeae</i>	Sundin & Jacobs 1999
		<i>Ligustrum vulgare</i>	Schreiber et al. 2005
Cellulomonadaceae	<i>Cellulomonas fimi</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer & Smalla 1997
	<i>Cellulomonas flavigena</i>	<i>Olera europaea</i>	Ercolani 1990
	<i>Cellulomonas</i> sp.	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000 Dianese et al. 2003
Microbacteriaceae	<i>Agreia pratensis</i>	Gras	Behrendt et al. 2002
	<i>Agromyces albus</i>	<i>Androsace</i> sp.	Dorofeeva et al. 2003
	<i>Clavibacter michiganensis</i>	<i>Arachis hypogaeae</i>	Jacobs & Sundin
	<i>Clavibacter</i> sp.	<i>Olera europaea</i>	Ercolani 1990
		<i>Arachis hypogaeae</i>	Sundin & Jacobs 1999
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000 Dianese et al. 2003
		Mango	de Jager et al. 2001
		<i>Fagus sylvatica</i>	Müller et al. 2003
		<i>Quercus petraea</i>	
		<i>Juglans regia</i>	diese Arbeit
	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Legard et al. 1994
		<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer et al. 1999
		<i>Arachis hypogaeae</i>	Jacobs & Sundin 2001
	<i>Curtobacterium herbarum</i>	Gras	Behrendt et al. 2002
	<i>Curtobacterium plantarum</i>	<i>Olera europaea</i>	Ercolani 1990
	<i>Curtobacterium</i> sp.	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer & Smalla 1997
		<i>Malus x domestica</i>	Kucheryava et al. 1999
		<i>Arachis hypogaeae</i>	Sundin & Jacobs 1999
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000
		Mango	de Jager et al. 2001
		<i>Fagus sylvatica</i>	Müller et al. 2003
		<i>Quercus petraea</i>	
		<i>Ulmus</i> sp.	Mocali et al. 2003
	<i>Frigoribacterium</i> sp.	<i>Vinca major</i>	Schreiber et al. 2005
	<i>Leifsonia aquaticum</i>	<i>Cichorium endivia</i> var. latifolia	Morris et al. 1998
	<i>Microbacterium foliorum</i>	Gras	Behrendt et al. 2001
	<i>Microbacterium lacticum</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Legard et al. 1994

	Art	Ursprung	Literaturquelle	
	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	Gras	Behrendt et al. 2001	
		<i>Hedera helix</i>	Schreiber et al. 2005	
	<i>Microbacterium resistens</i>	Gras	Behrendt et al. 2001	
	<i>Microbacterium saperdae</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer & Smalla 1997	
	<i>Microbacterium</i> sp.	<i>Arachis hypogaeae</i>	Sundin & Jacobs 1999	
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000	
		<i>Hedera helix</i>	Schreiber et al. 2005	
	<i>Plantibacter flavus</i>	Gras	Behrendt et al. 2002	
	<i>Rathayibacter caricis</i>	<i>Carex</i> sp.	Dorofeeva et al. 2002	
	<i>Rathayibacter festucae</i>	<i>Festuca rubra</i>	Dorofeeva et al. 2002	
Corynebacterineae				
Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium</i> sp.	<i>Phaseolus mungo</i>	Sebastian et al. 1987	
		<i>Triticum</i> sp.	Pati & Chandra 1993	
		<i>Lycopersicon esculentum</i>		
		<i>Solanum tuberosum</i>		
		<i>Musa</i> sp.		
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000	
Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium</i> sp.	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000	
Nocardiaceae	<i>Nocardia</i> sp.	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000	
Propionibacterineae				
Nocardiodaceae	<i>Nocardioides</i> sp.	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000	
Zellwandlose Formen				
Bacteroides				
Flavobacteria				
Flavobacteriales				
Flavobacteriaceae	<i>Chryseobacterium</i> sp.	<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer et al. 1999	
		<i>Empedobacter brevis</i>	Zuckerrohr	Pati & Chandra 1993
		<i>Flavobacterium</i> sp.	Zuckerrohr	Pati & Chandra 1993
		<i>Solanum tuberosum</i>	Heuer et al. 1999	
		<i>Tilandsia</i> sp.	Brighigna et al. 2000	
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000	
		<i>Myroides odoratus</i>	<i>Tilandsia</i> sp.	Brighigna et al. 2000
Sphingobacteria				
Sphingobacteriales				
Sphingobacteriaceae	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	<i>Tilandsia</i> sp.	Brighigna et al. 2000	
		<i>Tilandsia</i> sp.	Brighigna et al. 2000	
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000	
Flexibacteraceae	<i>Cytophaga</i> sp.	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jurkevitch & Shapira 2000	
		<i>Lolium perenne</i>	Hirano & Upper 2000	

3.3.2 ARDRA

Diese Untersuchung konnte zeigen, dass ARDRA eine einfach durchzuführende und, kostengünstige Methode ist, um unbekannte Arten phylogenetisch einzuordnen. Jede Art liefert ein unverwechselbares Muster, wenn die Aufschlüsselung durch die Auswahl der Enzyme hoch genug war.

Bei einigen Isolaten dieser Arbeit war die PCR leider nicht erfolgreich; für diese wurde die PCR zusätzlich mit isolierter DNA wiederholt, aber es wurden keine PCR-Produkte erhalten. Ursache hierfür könnten die Primer sein. Im Laufe der Untersuchungen wurde festgestellt, dass mit diesen Primern die besten Produkte für Proteobakterien erzielt werden konnten. Obwohl die Primer an hoch konservierten Stellen binden (Abbildung 62) und spezifisch für Eubacteria entworfen wurden, könnten kleine Sequenzunterschiede für Bakterien anderer Abteilungen eine Bindung erschweren. Ein weiteres Problem könnte die Sekundärstruktur der 16S rDNA sein; so genannte Haarnadelstrukturen können die Bindung der Primer an die DNA erschweren. Die Auswahl der Primer für die PCR ist sehr wichtig, da eine nachträgliche Änderung der Primer, z. B. eine andere Position in der Sequenz, die Fragmentlängen ändern würde und somit ein Vergleich mit Resultaten, die mit anderen Primern erzielt wurden, nur mit viel Aufwand möglich wäre.

Ein weiterer kritischer Punkt der Analyse ist die Längenvermessung der Banden. Bei hochprozentigen Agarosegelen ist die Agarosedichte im Gel nicht immer homogen, was leicht zu unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten führen kann. Die Qualität der Gelkammern ist ebenfalls ein wichtiger Punkt; wenn die Elektroden nicht optimal parallel ausgerichtet sind, kann es dazu führen, dass die Banden im Gel nicht gerade laufen, häufig findet man eine leicht gebogene Lauffront. Das Programm, das in dieser Arbeit zum Vermessen der Banden verwendet wurde kann die Abweichungen der Lauffront nicht ausgleichen. Es gäbe teure Gelanalyseprogramme, die dies leisten können. Eventuell ist ein inkorrektes Ausmessen der Bandenlängen die Ursache dafür, dass die *Pseudomonas*-Isolate aus dieser Arbeit und bereits bekannte *Pseudomonas* aus der Phyllosphäre, deren Sequenzen aus Datenbanken herausgesucht wurden, sich im Stammbaum auf getrennten Ästen befinden (Abbildung 33). Es wäre aufschlussreich bekannte *Pseudomonas*-Arten ARDRA zu unterziehen und die Ergebnisse mit den *in silico*-Ergebnissen zu vergleichen. Man könnte auch die Merkmalsgrenzen erweitern, was jedoch zu Kosten der Auflösung ginge, da man Arten einer Gattung wahrscheinlich nicht mehr unterscheiden könnte. Um unbekannte Arten besser zuordnen zu können, ist es sinnvoll sich eine Datenbank aus bekannten Arten anzulegen, um so bessere Vergleichsmöglichkeiten zu haben.

3.3.3 Populationsdichte und Besiedlungsverlauf

Die mikrobielle Besiedlung auf *Juglans regia* L. war von Mai bis Oktober starken Schwankungen unterworfen (Abbildung 30). Die Populationsdichten lagen mit Werten von $1.4 - 30 \cdot 10^3 \text{ CFU cm}^{-2}$ zwischen den Werten für *Fragaria ananassa*, einer laubabwerfenden, mehrjährigen krautigen Art (10^4 CFU cm^{-2}) und *Ilex aquifolium* L., einem immergrünen Gehölz (10^5 CFU cm^{-2}) (siehe 3.1.4), jedoch unter den Werten, die z.B. für Mango mit $8 \cdot 10^5 \text{ CFU cm}^{-2}$ ermittelt wurden (de Jager et al. 2001). Für andere Arten, wie z. B. *Phaseolus vulgaris*, wurden Werte bis 10^7 CFU cm^{-2} gefunden (Lindow & Leveau 2002, Lindow & Brandl 2003). Eine Zunahme der Epiphyten während der Saison, wie sie für viele Arten in der Literatur beschrieben ist (de Jager et al. 2001, Kinkel 1997), und häufig auf die zunehmende Durchlässigkeit der Kutikula zurückgeführt wird, lässt sich nicht erkennen. Vergleicht man die Populationsdichten mit den Wasserpermeabilitäten, so lässt sich kein direkter Zusammenhang erkennen. Von Mai bis Juli nahm die Anzahl der Epiphyten tendenziell zu, der Wasserwiderstand der Kutikula hingegen nahm mit zunehmender Wachsmenge ebenfalls zu (Abbildung 52), d. h. die Permeabilität der Kutikula sank. Im weiteren Verlauf, als die Durchlässigkeit der Kutikula wieder angestiegen war, lässt sich ebenfalls kein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl der Isolate und der Permeabilität erkennen. Allerdings sollte man hinsichtlich dieser Aussage bedenken, dass die elektronenmikroskopische Untersuchungen gezeigt haben, dass ein großer Anteil der eukaryotischen Isolate, im Besonderen Konidien, nur auf der Blattoberfläche liegen, sich jedoch nicht etabliert, d. h. ausgekeimt hatten (siehe Kapitel 3.2.3). Für die starke Schwankung konnte jedoch eine Erklärung gefunden werden. Betrachtet man die Wetterdaten der Tage vor den Probenahmen, so lässt sich deutlich erkennen, dass die Anzahl der Epiphyten mit den Klimabedingungen korreliert. In den letzten drei Tagen vor P1 lag die Tageshöchsttemperatur bei $17 - 20^\circ\text{C}$ und fiel in der Nacht nicht unter 6°C zudem fiel kein Niederschlag. Wenige Tage später war die Tageshöchsttemperatur auf $13.2 - 14.5^\circ\text{C}$ gefallen und sank nachts bis auf 4.6°C ab. In der Nacht vor der Probennahme P2 lag die Temperatur bei nur 3°C und es hatte geregnet. Dies könnte das starke Absinken der Populationsdichte innerhalb von vier Tagen erklären. Die Wetterdaten wurden der Internetseite des Meteorologischen Instituts der Universität Bonn entnommen. Die Wetterstation befindet sich auf dem Dach des Institutes, ca. 2 km nordwestlich des Versuchsbaumes. Für die Probennahmen im Juni galten ähnliche Bedingungen. Die Tagestemperaturen waren bei P4 niedriger als bei P3. Vor der Probennahme P5 lag die Tageshöchsttemperatur bei $24 - 30^\circ\text{C}$, sank nachts nicht unter 12°C und es fiel kein Niederschlag. Vor der Probennahme in September (P7) dagegen war die Temperatur nach einigen warmen Tagen ($28 - 30^\circ\text{C}$) und milden Nächten ($12 - 15^\circ\text{C}$) am Tag vorher mit maximal 16°C sehr niedrig und sank in der Nacht, regenbedingt, auf 4.5°C ab. Bei dieser Probennahme wurde die geringste Populationsdichte für Bakterien während der gesamten Saison gemessen (Tabelle 6). Im Oktober konnten trotz niedriger Temperaturen (tagsüber ca. 14°C) und

Niederschlag die meisten Epiphyten gezählt werden; dies ist wahrscheinlich durch die hohe Anzahl an Nekrosen bedingt, durch die vermehrt Nährstoffe aus dem Inneren auf die Blattoberfläche gelangt sein könnten (Abbildung 42). Vermutlich ist zudem eine große Anzahl der ausgezählten Mikroorganismen während der Isolation (Kapitel 3.1.5) durch die Nekrosen aus dem Blattinneren ausgespült worden. Auf den REM-Aufnahmen kann man deutlich Mikroorganismen innerhalb des Blattes erkennen (Abbildung 42).

Die Schwankungen der Populationsdichten bezüglich der prokaryotischen und eukaryotischen Isolate folgen annähernd dem gleichen Muster (Abbildung 30), ein weiteres Indiz für die Witterungsabhängigkeit. Eine bestimmte Abfolge während der Saison, wie sie in der Literatur aufgezählt wird (Bakterien – Hefen – filamentöse Pilze), konnte nicht beobachtet werden (Jacques & Morris 1995, Kinkel 1997). Allerdings wurden die Blätter erst untersucht nachdem sie voll expandiert waren, eventuell waren zu Beginn weniger Pilze vorhanden. Die Populationsdichten der pilzlichen Isolate lassen eine leicht steigende Tendenz erkennen (Abbildung 30), bei den mikroskopischen Untersuchungen konnte erkannt werden, dass die Etablierung der Pilze während der Saison zunimmt (3.2.3). Bei der Bestimmung der CFU durch Ausplattieren auf Medium werden jedoch auch solche Isolate gezählt, die sich noch nicht etabliert hatten.

Für Epiphyten auf Walnussblättern lässt sich folglich kein direkter Zusammenhang zwischen Blattalter, Wasserpermeabilität und Anzahl der Epiphyten erkennen, sondern die Populationsdichte scheint stark klimaabhängig zu sein. Zwischen der Populationsdichte und der Wachsmenge bzw. -zusammensetzung ließ sich ebenfalls keine Verbindung erkennen.

3.3.4 Zeitliche Entwicklung der mikrobiellen Diversität

Die Verteilung der Arten und Häufigkeit während der Vegetationsperiode ist in Abbildung 36 übersichtlich dargestellt. Da die PCR nicht immer erfolgreich war, konnten nicht alle Isolate identifiziert werden (Tabelle 7). Bei 66 % der ausgewählten Isolate konnte ARDRA durchgeführt werden; diese repräsentierten 49 % der insgesamt über den gesamten Untersuchungszeitraum isolierten Bakterien. Die nicht identifizierten Isolate repräsentieren häufig einen großen Anteil der gesamten Population zu einem bestimmten Zeitpunkt, der sich jedoch meist auf morphologisch identische Stämme aufteilt. Bei P1 repräsentierten fünf morphologisch identische, unidentifizierte Isolate 38 % der Gesamtbakterien. Bei P5 wurden durch zwei morphologisch identische Isolate 33 % bzw. durch vier identische 22 % repräsentiert. Bei P7 stellten vier morphologisch identische Stämme 40 % der Gesamtbakterien. Es wäre von großem Interesse diese zu bestimmen, da bei jeder Probennahme festgestellt werden konnte, dass jeweils ein Stamm eine überdurchschnittlich hohe Populationsdichte aufwies (Abbildung 36, Tabelle 16, im Anhang) und es sich in den meisten Fällen um potentielle Phytopathogene handelte. Zusätzlich fanden sich jeweils 1 - 3 Stämme

mit ebenfalls relativ hohen Dichten, die restlichen Typen wiesen niedrige Populationsdichten zwischen 0.47 und 200 CFU cm⁻² auf. Vermutlich bilden die Arten, die in großen Populationsdichten gefunden wurden die Biofilme, während die weniger häufigen Arten statistisch über die Blattoberfläche verteilt sind. Von jeder Probennahme konnten jeweils 6 – 8 Arten bestimmt werden. Die nicht bestimmten Arten sind mit großer Wahrscheinlichkeit verschieden von denen mit erfolgreicher PCR, da einige Arten mehrfach selektiert wurde (Tabelle 15) und die PCR mehrfach erfolgreich war. Damit konnte indirekt gezeigt werden, dass es sich bei den Fehlenden um andere Arten handeln sollte.

Über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg betrug der Anteil der γ -Proteobakterien an den Gesamtbakterien 21%, α -Proteobakterien 12 %, Gram-Positive mit hohem GC-Gehalt 1.3 %, Gram-Positive mit niedrigem GC-Gehalt 0.6 % und β -Proteobakterien 0.2 %. Der Anteil derjenigen Typen, die nicht zugeordnet werden konnten, betrug 14 %.

Zu Beginn der Vegetationsperiode wurden die Blätter überwiegend von γ -Proteobacteria besiedelt. Zunächst dominierten die die Enterobacteriaceae gemeinsam mit den Xanthobacteriaceae, dann nahmen sie sukzessive ab (Mai – Juni), ab Juli waren sie völlig verschwunden. Bei den Pseudomonadaceae wurde die höchste Vielfalt bei P3 (Juli) beobachtet, generell lässt sich keine Gesetzmäßigkeit erkennen. Es scheint als wären die Gram-positiven Arten durch die α - und β -Proteobacteria ersetzt worden, da nur bei P2 aus beiden Gruppen je eine Art gefunden wurde. In der Literatur wird eine generelle Zunahme der Population für viele verschiedene Bakterien während der Vegetationsperiode, wie sie in der Literatur beschrieben ist (Kinkel 1997), konnte in dieser Arbeit sowohl für einzelne Arten, als auch die Gesamtpopulation nicht beobachtet werden. *Pseudomonas*-Arten auf *Beta vulgaris* (Zuckerrübe) zeigten ebenfalls eine stark schwankende Verteilung während der Vegetationsperiode (Ellis et al. 1999). In einer zwei Jahre dauernden Studie zu mikrobiellen Populationsdichten auf verschiedenen mediterranen Pflanzenarten konnte ebenfalls kein direkter Zusammenhang zwischen Jahreszeit und Populationsdichte gefunden werden, welcher vermutlich auf die Klimabedingungen zurückzuführen war, auch innerhalb der Pflanzenarten zeigten sich große Unterschiede (Yadav et al. 2004). Eine vergleichbare, detaillierte Studie zur bakteriellen Diversität während der Vegetationsperiode unter ähnlichen Bedingungen konnte nicht gefunden werden. Die meisten Studien liefern nur ein punktuelles Abbild der mikrobiellen Diversität (Jurkevitch & Schapira 2000, Padaga et al. 2000, Müller et al. 2003) oder sind aufgrund der abweichenden klimatischen Bedingungen (Brighigna et al. 2000, Yadav et al. 2004) und den Eigenschaften der Versuchspflanze (z. B. immergrün, Ercolani 1991) nicht zum Vergleich geeignet.

Während des Untersuchungszeitraumes ließ sich eine Verschiebung von helleren zu dunkler pigmentierten Arten beobachten, dies könnte eine Anpassung an die hohe UV-Strahlung im Sommer sein. Viele Phyllosphärenbakterien produzieren Pigmente als Schutz von UV-Strahlung,

die höchste UV-Toleranz zeigten Arten mit rosa- oder orangefarbener Pigmentierung (Sundin & Jacobs 1999, Jacobs & Sundin 2001).

3.3.5 Biofilme

Die Blattoberflächen von *Juglans regia* waren sowohl auf der Ober-, als auch Unterseite wenig dicht besiedelt. Man fand zumeist nur vereinzelte Organismen oder Biofilme. Die dennoch relativ hohen Populationsdichten wurden vermutlich durch die Mikroorganismen aus den Biofilmen verursacht, die vor allem auf der abaxialen Seite im Bereich der Trichome zu finden waren (Abbildung 50). Auch auf Kantalupe-Blättern (Warzenmelone) waren ca. 70 % der Mikroorganismen in Biofilmen organisiert, für die meisten Pflanzenarten sind vermutlich nur 35 % in Biofilmen (Beattie et al. 2002). Die Biofilme auf *Juglans* befanden sich bevorzugt entlang von Blattadern (Abbildung 50a - c), Drüsen (Abbildung 50d) und Stomata (Abbildung 50e – g), kleinere Biofilme in Vertiefungen (Abbildung 50h). Diese Lokalisationen sind auch mehrfach für verschiedene Arten beschrieben worden (Kinkel 1997, Morris & Jacques 1997, Leveau & Lindow 2001, Beattie et al 2002, Monier & Lindow 2003).

Drüsen und Drüsenhaare scheiden Zucker, ätherische Öle, Proteine, flüchtige Verbindungen und Schleim ab (Beattie et al. 2002), diese können von Mikroorganismen als Kohlenstoffquellen genutzt werden. Auf *Chicorium endivia* var. *latifolia* waren 90 % der Biofilme an Drüsenhaaren befestigt (Morris & Jacques 1997). Auf *Fragaria ananassa* und *Rubus* sp. L. wurde der überwiegende Teil der Mikroorganismen auf Trichomen, häufig auch in Aggregaten von wenigen Zellen beobachtet (Krimm 2001, eigene unveröffentlichte Daten). Auf Blattadern und in direkter Nähe ist die Konzentration von Nährstoffen vermutlich höher (siehe Kapitel 2.3.2); auch für die Vertiefungen zwischen den Zellen wird dieses vermutet (Leveau & Lindow 2002).

Die Struktur der Biofilme kann sehr unterschiedlich sein. Sehr dünne Filme, evtl. nur eine Zellschicht dick und in eine gute sichtbare Matrix eingebettet (Abbildung 50e, g) waren weniger häufig zu finden, als dicke Biofilme mit einer Matrix, die auf den REM-Aufnahmen präparationsbedingt in Krusten zerbrochen sind (Pfeile in Abbildung 51a). Viele der Biofilme, die auf *Juglans* gefunden wurden, bestanden aus mehreren Zellschichten, deren Matrix nicht zu sehen war (Abbildung 50c, d, f). Die Spalten in den Biofilmen sind durch die Präparation entstanden (Abbildung 51d). Das Mikrohobbyat für Mikroorganismen unterscheidet sich von dem eines solitären Organismus durch die Matrix die die Zellen umgibt.

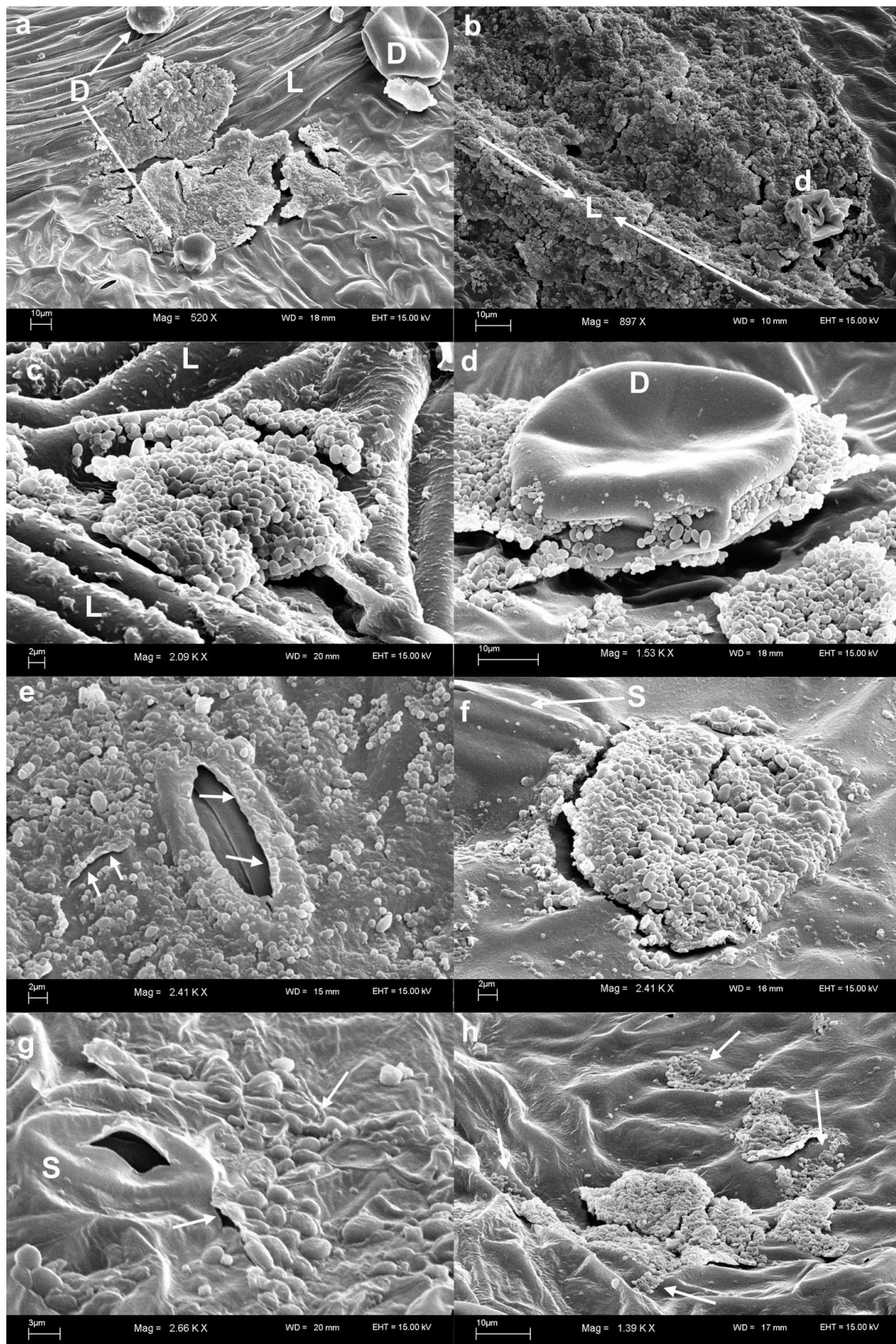
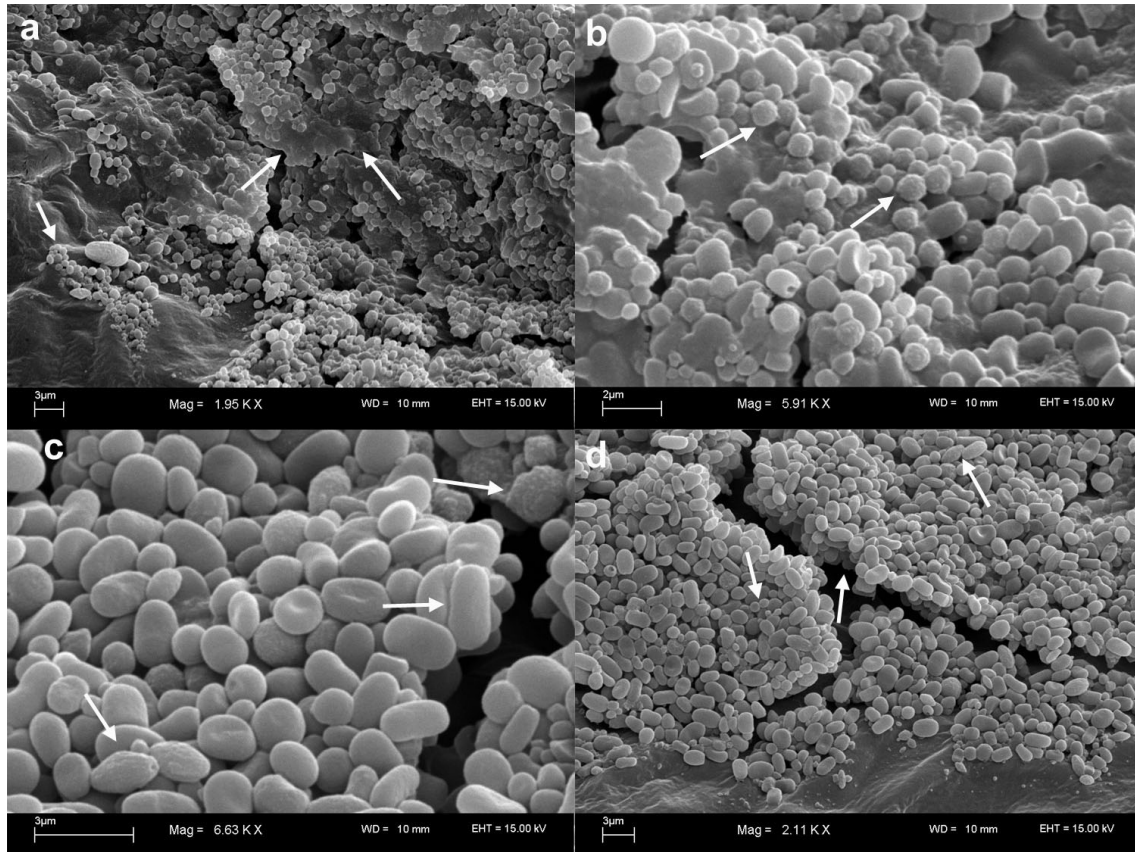


Abbildung 50 Bevorzugte Biofilm-Lokalisationen

Der Größenmaßstab ist auf jedem Bild angegeben. a) Biofilm an einer Blattader, Unterseite, September; b) großer Biofilm auf einem Leitbündel, Unterseite, Juni; c) Biofilm auf einem Leitbündel, Oberseite, August, Detail von Abbildung 40b; d) Biofilm um und auf Drüse, Unterseite, September; Detail von Abbildung 41d e) Biofilm neben Stomata, Unterseite August, Detail von Abbildung 40b; f) Biofilm neben Stomata, Unterseite, September; g) Biofilm neben Stomata, Unterseite, August, Detail von Abbildung 40h; h) kleine Biofilme in Vertiefungen, August. Abkürzungen: D Drüsen, d kleine Drüse, L Leitbündel, S Stoma.

**Abbildung 51 Details von Biofilmen**

Alle Aufnahmen stammen von der Blattunterseite. Der Größenmaßstab ist auf jedem Bild angegeben. a) Mikroorganismen sind in eine dichte Matrix eingebettet, diese ist präparationsbedingt in Krusten zerbrochen (Pfeile rechts), Anhäufung sehr kleiner coccaler Organismen (kleiner Pfeil); b) verschiedene Mikroorganismen in einer Matrix, coccale Organismen mit strukturierter Oberfläche (Pfeile); c) Biofilm ohne erkennbare Matrix, die Pfeile weisen auf Organismen unterschiedlicher bzw. auffälliger Textur hin; d) an der Bruchkante sind deutlich mehrere Zellschichten erkennbar (mittlerer Pfeil), verschiedene Organismen nebeneinander (äußere Pfeile).

Die Matrix setzt sich aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS: Polysaccharide, Proteine, Nukleinsäuren.) u.a Verbindungen zusammen (Davey & O'Toole 2000). Sie hat verschiedene Funktionen, wie z. B. Nährstoffspeicher, Konzentrierung von Enzymen, die zu erhöhter metabolischer Aktivität führen, Barriere gegen schädliche Umwelteinflüsse (Beattie et al. 2002), aber auch Schutz gegen Umweltstressfaktoren wie Austrocknen, UV-Strahlung, osmotischer Schock und pH-Wertänderungen (Davey & O'Toole 2000). In einem Modellversuch mit *Pseudomonas syringae* auf *Phaseolus vulgaris* konnte gezeigt werden, dass unter Trockenstressbedingungen die Anzahl der lebenden solitären Organismen drastisch sank, während ca. 95 % der lebenden Zellen in

Aggregaten vorkamen. Je größer die Aggregate waren, desto größer war der Anteil der (über)lebenden Zellen (Monier & Lindow 2003). Aus den REM-Aufnahmen lässt sich schließen, dass die Artzusammensetzung in den Biofilmen sehr variabel ist. Morphologische Unterschiede wie Form, Textur und Größe lassen sich deutlich erkennen (Abbildung 51b, c). Die Mikroorganismen scheinen nicht in Clustern, sondern in heterogenen Gemischen vorzuliegen (Abbildung 51). Die Artzusammensetzung in Biofilmen ist unter natürlichen Bedingungen nicht homogen, sondern variiert stark. Es werden Gram-negative und Gram-positive Bakterien ebenso gefunden wie auch Hefen und filamentöse Pilze. Die Anzahl der CFU, die man von einem Biofilm kultivieren kann schwankt stark und ist nicht abhängig von der Größe des Biofilms. Viel Spezies, die aus Biofilmen isoliert werden lassen sich nur schwer oder später gar nicht mehr kultivieren (Morris & Jacques 1997).

Die Organisation von Bakterien in Biofilmen hat für die Organismen viele Vorteile. Die Matrix bietet Schutz für die Organismen (Beattie et al. 2002, Davey & O'Toole 2000). Die Bakterien kooperieren beim Abbau von Pestiziden und Fremdstoffen, sie existieren als Kommensalen indem sie jeweils die metatobischen Nebenprodukte des anderen benutzen. (Beattie et al. 2002). Diese Koexistenz ist vor allem im Bereich der Abwasserreinigung gut untersucht. Die räumliche Nähe im Biofilm ist eine gute Voraussetzung für horizontalen Gentransfer, der bei der Evolution und genetische Diversität in natürlichen mikrobiellen Gemeinschaften eine wichtige Rolle spielt (Davey & O'Toole 2000). Phyllosphärenbakterien haben viele Plasmide und es konnten hohe Plasmidtransferaten festgestellt werden (Lindow & Leveau 2002). Organismen in einem Biofilm haben somit einen evolutionären Vorteil, der es ihnen ermöglicht sich schnell an geänderte Bedingung anzupassen.

3.3.6 Kutikula

Die Kutikula der Blattoberseite durchlief während der Saison eine Veränderung. Die epikutikularen Wachskristalle wurden von Mai bis Juli aufgebaut und ihre Morphologie veränderte sich. Ab August wurde eine zunehmende Erosion der Wachse beobachtet, welche vermutlich durch Niederschlag, Partikeleinschlag und Wind ausgelöst wird (Beattie 2002). Vielfach konnte man, vor allem auf exponierten Stellen wie Leitbündeln und dem Blattrand, Abschleifungen sehen, welche durch Aneinanderreiben und Verbiegen der Blätter durch Wind verursacht wurden. Die Erosion fand vermutlich auch während die Wachsschicht aufgebaut wurde statt, durch die ständige Proliferation von neuem Wachs fiel dies jedoch weniger auf. Luftverschmutzungen, die durch Regen ausgewaschen werden und auf die Blattoberfläche gelangen können eine strukturelle Veränderung der epikutikularen Wachse, wie z. B. eine beschleunigte Fusion von Wachskristallen, bewirken (Beattie 2002).

3.3.7 Wasserpermeabilität und Wachsanalyse

Die Ergebnisse der Wachsanalyse stimmen gut mit den Daten von Knoll & Schreiber (1998) überein. Das Fehlen von Estern und Triterpenen könnte auf die kürzere Extraktionszeit (10 s) zurück zu führen sein, ebenso die niedrigere Wachsbelegung. Knoll & Schreiber finden die größte Wachsbelegung im Juni, wo hingegen in der vorliegenden Untersuchung das Maximum im Juli gefunden wurde (Abbildung 52). Die Kettenlängenverteilung der einzelnen Substanzklassen entspricht den Ergebnissen von Prasad & Gülz (1990). Prasad & Gülz berichten jedoch von einem hohen Anteil an Juglon im Wachs (ca. 30 %), der weder in dieser Untersuchung, noch von Knoll & Schreiber bestätigt wird. Juglon (5-Hydroxy-1,4-Naphtoquinon) ist eine Substanz mit allelopatischer Wirkung, die in allen Pflanzenteilen der Walnuss gefunden wird, überwiegend aber in Wurzeln, Faserhüllen und Blattknospen (Dana & Lerner 1994). *Juglans regia* L. ist vor allem auf der Blattunterseite dicht mit ungestielten Drüsenhaaren besetzt (Abbildung 37d). Vermutlich wurde durch die relativ lange Extraktionszeit von 2 min in Chloroform bei Prasad & Gülz Juglon aus den Drüsen extrahiert.

Die kutikularen Wachse bilden die wesentliche Barriere für Wasser und andere Stoffe (Riederer 1991, Riederer & Schreiber 2001). Die Permeabilität der *Juglans regia* Blattscheiben sank mit zunehmender Wachsmenge und stieg mit abnehmender Wachsmenge wieder an, wie in Abbildung 52 deutlich erkennbar ist.

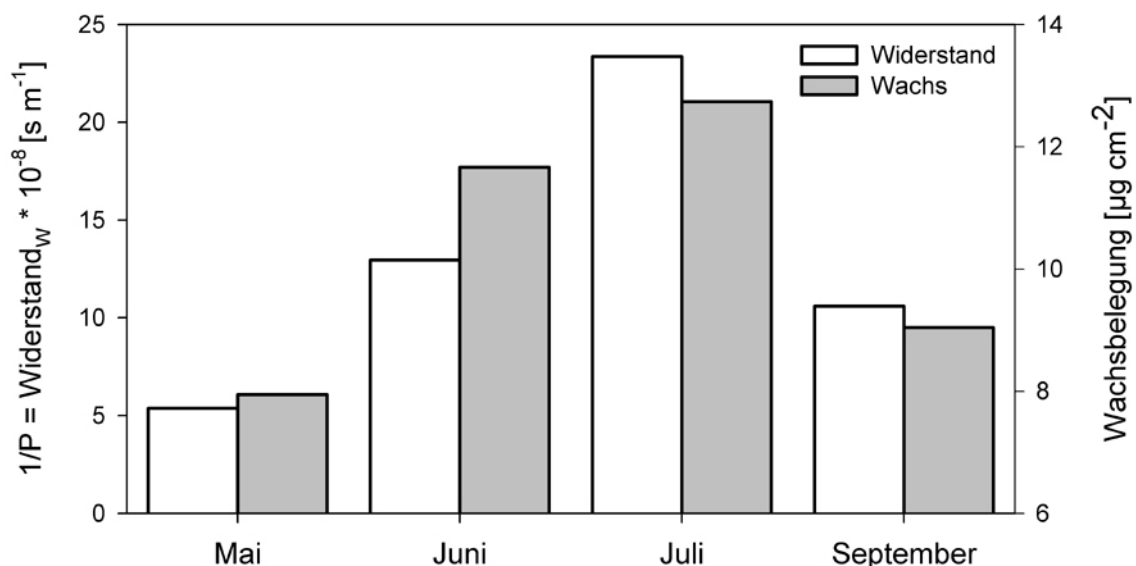


Abbildung 52 Zusammenhang zwischen dem Wasserwiderstandes ($1/P$) von *Juglans*-Blattscheiben und der Wachsbelegung im Saisonverlauf

$R^2 = 0.83$. Der Widerstand wurde aus dem Mittelwert des Leitwertes für den jeweiligen Monat berechnet.

Der niedrigste Leitwert betrug im Juli $4.28 \cdot 10^{-10} \text{ m s}^{-1}$ (Lit.: $4.59 \cdot 10^{-10} \text{ m s}^{-1}$, Riederer & Schreiber 2001). Wie für 24 Arten aus verschiedenen Habitaten gezeigt werden konnte, ist die

Permeabilität der Kutikula unabhängig von der Dicke der Kutikula und der Wachsmenge (Schreiber & Riederer 1996). Innerhalb einer Art jedoch, korreliert die Wachsmenge mit der Permeabilität bzw. dem Widerstand, wenn es sich um Wachs annähernd gleicher Wachszusammensetzung handelt. Dieser Zusammenhang lässt sich anhand der Ergebnisse der Wachsanalyse und Permeabilitätsmessung gut belegen, da die Wachsbelegung von *Juglans regia* L. mit dem kutikularen Widerstand für Wasser positiv korreliert ist ($r^2 = 0.835$) (Abbildung 53).

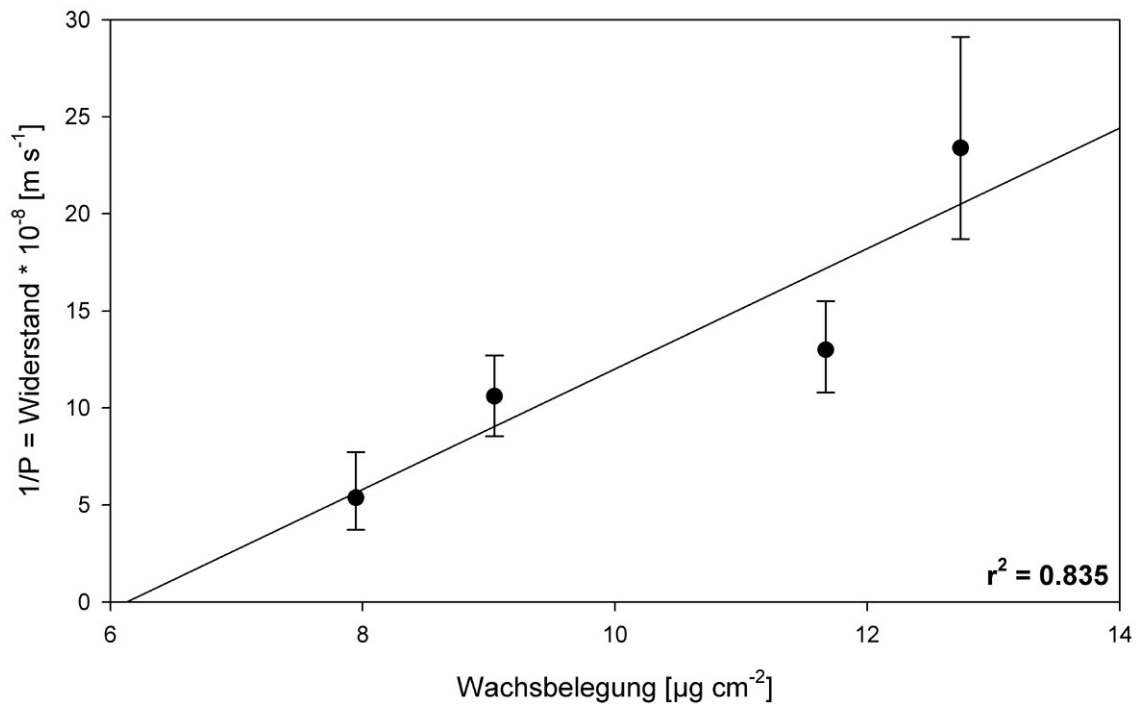


Abbildung 53 Korrelation des Wasserwiderstandes ($1/P$) von *Juglans*-Blattscheiben und der Wachsbelegung

4 ABSCHLIESSENDE DISKUSSION UND AUSBLICK

Mit dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine multifaktorielle Analyse der Veränderungen während der Vegetationsperiode in der Phyllosphäre von *Juglans regia* L. durchgeführt. Es konnte eine große Varietät an bakteriellen Epiphyten isoliert und identifiziert werden. Es wurde ein breites Spektrum an Arten gefunden, die fast alle bereits in Assoziation mit Pflanzen beschrieben wurden (Tabelle 10). Zur Komplettierung des Gesamtbildes sollte die Identifizierung der noch nicht bestimmten Arten vorangetrieben werden. Um im Bedarfsfall spezifische Primer zu entwickeln, wäre es hilfreich diese Isolate zuvor mit klassischen Methoden phylogenetisch einzuordnen. Wie in der wegweisenden Arbeit von Yang et al. (2001) gezeigt werden konnte, ist die Artzusammensetzung der Phyllosphäre weitaus komplexer als angenommen. Es konnten viele noch nicht identifizierte Arten identifiziert werden. Dieser Ansatz wurde in dieser Arbeit ebenfalls verfolgt (Daten nicht gezeigt), allerdings nicht erfolgreich. Eine direkte Verwendung der aufkonzentrierten Waschlösung (3.1.5) lieferte kein PCR-Produkt, wahrscheinlich hemmen Substanzen von der Blattoberfläche die PCR, wie bereits für *Fragaria* gezeigt werden konnte (Krimm 2001). Die Isolierung der DNA wird durch die relativ niedrige Anzahl an Organismen und damit geringe Menge an DNA erschwert, auch die Zugabe von DNA (auf die Primer nicht greifen) als Fällhilfe, brachte keine Verbesserung. Dieser Ansatz sollte dennoch weiterverfolgt werden, um einen Gesamtüberblick über die Artenzusammensetzung zu gewinnen. Die Populationsdichte auf *Juglans* lag mit $1.4 - 30 \cdot 10^3$ CFU cm⁻² im Bereich der Literaturwerte, allerdings wurde durch die mikroskopischen Untersuchungen deutlich, dass vermutlich ein großer Teil der Mikroorganismen in Biofilmen organisiert ist. Eine Isolation einzelner Biofilme mit der von Morris und Mitarbeitern (1998) entwickelten Methode und anschließender Identifikation könnte Aufschluss über die Zusammensetzung der Biofilme liefern. Man könnte zudem versuchen die Biofilme in Kultur zu halten, eventuell gelingt so die Kultivierung bisher nicht kultivierter Arten in Co-Kultur mit kultivierbaren Arten. Eine Relation zwischen den Populationsdichten und der Wasserpermeabilität der Kutikula konnte nicht festgestellt werden. Auch die Veränderung in der Morphologie und Zusammensetzung der kutikularen Wachse schienen keine Auswirkung auf die Populationen zu haben. Über diesen Punkt könnte man Klarheit erhalten, wenn man mit gleich bleibenden Klimabedingungen arbeiten könnte, was unter natürlichen Bedingungen aber unmöglich ist. Man könnte im Modellversuch mit bekannten Phyllosphärenorganismen unter kontrollierten Bedingungen arbeiten, dabei wären jedoch der natürliche Faktor Immigration ausgeschlossen, der unter natürlichen Bedingungen eine wichtige Rolle spielt. Die morphologischen Veränderungen der Kutikula der Blattoberseite spiegelten sich nicht in der Wachszusammensetzung wieder. Eine getrennte Analyse der Wachse von Blattober- und Unterseite könnte Unterschiede aufzeigen. Um zusätzlich Aufschluss über die epikutikularen Wachse zu erhalten, die sich direkt auf der Oberfläche befin-

den, könnte man nach der von Jetter et al. (2000) entwickelten Methode die epikutikularen Wachse mechanisch isolieren und deren Zusammensetzung während der Vegetationsperiode studieren.

In dem zweiten Teil der Arbeit am Beispiel der Wasser- und Nährstoffverfügbarkeit zwei limitierende Faktoren der Lebensbedingungen für Mikroorganismen im Modellversuch analysiert. Ausgehend von der Erkenntnis, dass Bakterien die Benetzbarkeit künstlicher und pflanzlicher Oberflächen erhöhen können und infolgedessen ihre ökologische Fitness erhöhen (Bunster 1989, Knoll & Schreiber 1998, Knoll und Schreiber 2000), wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Bakterien die Permeabilität der Kutikula für Wasser erhöhen können. Für mehrere Bakterienarten aus verschiedenen Gattungen konnte eine Erhöhung der Wasserpermeabilität nachgewiesen werden. Die höchsten Effekte bewirkte *Pseudomonas rhizosphaerae*, mit zunehmender Zellzahl konnte ein zunehmender Anstieg der Permeabilität auf 60 % gemessen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der Permeabilität auf Substanzen zurückzuführen sind, die von den Bakterien abgesondert werden. Eine chemische Analyse und Identifizierung steht noch aus. Unter Umständen handelt es sich um Syringomycin, das von *Pseudomonas syringae*-Stämmen bekannt ist und ein wirkungsvolles Biosurfactant ist (Lindow & Brandl 2003). Die Nährstoffverfügbarkeit wurde am Beispiel der Fruktose untersucht. Mit Hilfe eines Bioreportes (Leveau & Lindow 2001) konnten die räumlichen Verteilungsmuster am Kutikula-Modell und auf der Pflanze aufgezeigt werden. Dabei wurde eine höhere Fruktoseverfügbarkeit in Bereichen detektiert, die in der Literatur übereinstimmend als bevorzugte Lokalisationen beschrieben sind (Kinkel 1997, Morris et al. 1997, Leveau & Lindow 2001, Beattie et al 2002, Monier & Lindow 2003). Zusätzlich wurde erstmals die Fruktosepermeabilität der Kutikula in Relation zur Wasserpermeabilität im Kutikula-Modellsystem gemessen. Für *Prunus laurocerasus* betrug die Fruktosepermeabilität bei sehr niedrigen Konzentrationen 1/6 der Wasserpermeabilität. Mit steigender Konzentration sank die Fruktosepermeabilität exponentiell auf 1/35 der Wasserpermeabilität ab. Als nächstes sollte überprüft werden ob die Fruktosepermeabilität tatsächlich exponential mit der Konzentration fällt, welche Rolle die Temperatur spielt, und ob dies auch auf andere Arten übertragbar ist. Von besonderem Interesse wäre es der Fragestellung nachzugehen, ob Bakterien nicht nur die Wasserpermeabilität, sondern auch die Fruktosepermeabilität beeinflussen können. Durch die Messung des Fruktoseleitwertes konnte gezeigt werden, dass die Permeabilität der *Prunus*-Kutikula ausreichend hoch ist, um das Wachstum von 10^4 Bakterien cm^{-2} zu gewährleisten. Da die Biofilme in der Regel vielfach höhere Dichten aufweisen, wäre es interessant herauszufinden welche Art der Interaktion und Beeinflussung des Habitates hierbei eine Rolle spielen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Interaktion von Bakterien mit Blattoberflächen wurde durch die Inokulation der Kutikula mit verschiedenen Phyllosphärenisolaten der Gattungen *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* und *Achromobacter* untersucht. Diese zeigten unterschiedliche hohe Effekte auf die Wasserpermeabilität der Kutikula. Die Arten *P. graminis* und *P. rhizosphaerae* waren besonders effektiv, sie bewirkten eine Erhöhung der Wasserpermeabilität um 50 %. Für *P. rhizosphaerae* konnte gezeigt werden, dass die Beeinflussung der Kutikula durch Substanzen bewirkt wurde, die von den Zellen in das Medium abgegeben wurden. Die Bakterien waren somit in der Lage die physikochemischen Barriereigenschaften der Kutikula zu ihren Gunsten zu modifizieren.

Mit Hilfe eines fruktosesensitiven Bioreporters konnte die Heterogenität der Kutikula bezüglich ihrer Permeabilität für Fruktose gezeigt werden. Stellen hoher Permeabilität befanden sich entlang der Kutikularleisten, in der Nähe von Drüsen und Leitbündeln. Im Kutikula-Modellversuch konnte gezeigt werden, dass die Permeabilität für Fruktose über *Prunus laurocerasus* L.-Kutikularmembranen hoch genug ist, um Populationsdichten von 10^4 CFU cm⁻² mit Fruktose zu versorgen. Der Leitwert für Fruktose ist abhängig von der Konzentration im Donorkompartiment, mit steigender Konzentration sank der Leitwert auf $1.1 \cdot 10^{-11}$ m s⁻¹ und war 35 mal niedriger als der Wasserleitwert der selben Kutikularmembranen.

Die Untersuchung der Phyllosphäre von Walnuss (*Juglans regia* L.) zeigte, dass die mikrobiellen Populationen während der Vegetationsperiode starken Schwankungen unterworfen waren. Die Populationsdichten variierten in Abhängigkeit von den klimatischen Bedingungen zwischen 10^3 und 10^4 CFU cm⁻². Ein Zusammenhang zwischen der Wasserpermeabilität der Kutikula und der Populationsdichte ließ sich nicht nachweisen. Die kutikulare Wachszusammensetzung hatte ebenfalls keinen erkennbaren Einfluss auf die mikrobiellen Epiphyten. Der kutikulare Wasserwiderstand war positiv mit der Wachsbelegung korreliert. Mittels ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) konnten ca. 50 % aller Epiphyten während der gesamten Vegetationsperiode identifiziert werden. Es wurden Arten der Gattungen *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Caulobacter*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Burkholderia* und *Bacillus* gefunden. Der überwiegende Teil der Mikroorganismen war vor allem auf der abaxialen Seite in Biofilmen organisiert. Weite Teile der Blattoberflächen waren nur sehr unregelmäßig von einzelnen Mikroorganismen besiedelt.

6 VERZEICHNISSE

6.1 Literatur

- Abebanjo A & Bankole S A** (2004) Evaluation of some fungi and bacteria for biocontrol of anthracnose disease of cowpea. *Journal of Basic Microbiology*. 44 (1): 3-9.
- Adam G, Lugger P, Stark G** (1995) *Physikalische Chemie und Biophysik*. Springer Verlag, Heidelberg.
- Altschul S F, Madden T L, Schäffer A A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D J** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25 (17): 3389-3402.
- Amann R I, Ludwig W, Schleifer K-H** (1995) Phylogenetic identification an *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*. 59 (1): 143-169.
- Assis S M P, Mariano R L R, Michereff S J, Silva G, Maranhao E A A** (2002) Anatagonism of yeasts to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on cabbage phylloplane in field. *Revista de Microbiologia*. 30: 191-195.
- Axtell C A & Beattie G A** (2002) Construction and characterization of a *proU-gfp* transcriptional fusion that measures water availability in a microbial habitat. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (9): 4604-4612.
- Barthlott W & Ehler N** (1977) Raster-Elektronenmikroskopie der Epidermis-Oberflächen von Spermatophyten. *Tropische und subtropische Pflanzenwelt*. 19: 367-467.
- Barthlott W, Neinhuis C, Cutler D, Ditsch F, Meusel I, Theisen I, Wilhelmi H** (1998) Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 126: 237-260.
- Baur P & Schönherr J** (1996) Die Aufnahme systemischer Wirkstoffe über Blätter: Grundlagen und Optimierung. *Gartenbauwissenschaft*. 61 (3): 105-115.
- Baur P** (1997) Lognormal distribution of water permeability and organic solute mobility in plant cuticles. *Plant, Cell and Environment*. 20: 167-177.

- Beattie G A** (2002) Leaf surface waxes and the process of leaf colonization by microorganisms. S. 3-26 in *Phyllosphere microbiology*, The American Phytopathological Society, St. Paul.
- Beattie G A, Barnes M B, McLean R J C** (2002) Biofilms on leaf surfaces: Implications for the biology, ecology and management of populations of epiphytic bacteria. S. 139-155 in *Phyllosphere microbiology*, The American Phytopathological Society, St. Paul.
- Behrendt U, Ulrich A, Schumann P, Erler W, Burghardt J, Seyfarth W** (1999) A taxonomic study of bacteria isolated from grasses: A proposed new species *Pseudomonas graminis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49: 297-308.
- Behrendt U, Ulrich A, Schumann P** (2001) Description of *Microbacterium foliorum* sp. nov. and *Microbacterium phyllosphaerae* sp. nov., isolated from the phyllosphere of grasses and the surface litter after mulching the sward, and reclassification of *Aureobacterium resistens* (Funke et al. 1998) as *Microbacterium resistens* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51 (4): 1267-1276.
- Behrendt U, Ulrich A, Schumann P, Naumann D, Suzuki K** (2002) Diversity of grass-associated Microbacteriaceae isolated from the phyllosphere and litter layer after mulching the sward; polyphasic characterization of *Subtercola pratensis* sp. nov., *Curtobacterium herbarum* sp. nov. and *Plantibacter flavus* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52 (5): 1441-1454.
- Behrendt U, Ulrich A, Schumann P** (2003) Fluorescent pseudomonads associated with the phyllosphere of grasses; *Pseudomonas trivialis* sp. nov., *Pseudomonas poae* sp. nov. and *Pseudomonas congelans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53: 1461-1469.
- Blakeman J P** (1993) Pathogens in the foliar environment. *Plant Pathology*. 42: 479-493.
- Brenner D J, Hollis D G, Moss C W, English C K, Hall G S, Vincent J, Radosevic J, Birkness K A, Bibb W F, Quinn F D** (1991) Proposal of *Afipia* gen. nov., with *Afipia felis* sp. nov. (formerly the cat scratch disease bacillus), *Afipia clevelandensis* sp. nov. (formerly the Cleveland Clinic Foundation strain), *Afipia broomeae* sp. nov., and three unnamed genospecies. *Journal of Clinical Microbiology*. 29 (11): 2450-2460.
- Brighigna L, Gori A, Gonnelli S, Favilli F** (2000) The influence of air pollution on the phyllosphere microflora composition of *Tillandsia leaves* (Bromeliaceae). *Revista de Biologia Tropical*. 48 (2-3): 511-517.

- Brunel B, Perissol C, Fernandez M, Boeufgras J M, Le Petit J** (1994) Occurrence of *Bacillus* species on evergreen oak leaves. *FEMS Microbiology Ecology*. 14: 331-342.
- Bunster L, Fokkema N J, Schippers B** (1989) Effect of surface-active *Pseudomonas* spp. on leaf wettability. *Applied and Environmental Microbiology*. 55 (6): 1340-1345.
- Busse H-J, Denner E B M, Buczolits S, Saklinoja-Salonen M, Bennisar A, Kämpfer P** (2003) *Sphingomonas aurantiaca* sp. nov., *Sphingomonas aerolata* sp. nov., *Sphingomonas faeni* sp. nov., air- and dustborne and antarctic, orange-pigmented, psychrotolerant bacteria, and emended description of the genus *Sphingomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53: 1253-1260.
- Calvo J, Calvente V, de Orallano M E, Benuzzi D, de Tosetti M I S** (2003) Improvement in the biocontrol of postharvest diseases of apples with the use of yeast mixtures. *BioControl*. 48: 579-593.
- Cooper D G & Zajic J E** (1980) Surface active compounds from microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*. 26: 229-253.
- Daayf F, Adam L, Fernando W G D** (2003) Comparative screening of bacteria for biological control of potato late blight (strain US-8), using *in-vitro*, detached-leaves, and whole-plant testing systems. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne de Phytopathologie*. 25 (3): 276-284.
- Dana M N & Lerner B R** (1994) Black walnut toxicity. *Purdue University Cooperative Extension Service*. 02: 1-2.
- Davey M E & O'Toole G A** (2000) Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64 (4): 847-867.
- de Jager E S, Wehner F C, Korsten L** (2001) Microbial ecology of the mango phylloplane. *Microbial Ecology*. 42: 201-207.
- Dianese A C, Ji P, Wilson M** (2003) Nutrition similarity between leaf-associated nonpathogenic bacteria and the pathogen is not predictive of efficacy in biological control of bacterial spot on tomato. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (6): 3484-3491.
- Dorofeeva L V, Evtushenko L I, Krausova V I, Karpov A V, Subbotin S A, Tiedje J M** (2002) *Rathayibacter caricis* sp. nov. and *Rathayibacter festucae* sp. nov., isolated from the

- phyllosphere of *Carex* sp. and the leaf gall induced by the nematode *Anguina graminis* on *Festuca rubra* L., respectively. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 52: 1917-1923.
- Dorofeeva L V, Krausova V I, Evtushenko L I, Tiedje J M** (2003) *Agromyces albus* sp. nov., isolated from a plant (*Androsace* sp.). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 53: 1435-1438.
- Ellis R J, Thompson I P, Bailey M J** (1999) Temporal fluctuations in the pseudomonad population associated with sugar beet leaves. FEMS Microbiology Ecology. 28: 345-356.
- Ercolani G L** (1991) Distribution of epiphytic bacteria on olive leaves and the influence of leaf age and sampling time. Microbial Ecology. 21: 35-48.
- Felsenstein J** (1989) PHYLIP - Phylogeny inference package (Version 3.2). Cladistics. 5: 164-166.
- Fiddaman P J, O'Neil T M, Rossall S** (2000) Screening of bacteria for the suppression of *Botrytis cinerea* and *Rhizoctonia solani* on lettuce (*Lactuca sativa*) using leaf disc bioassays. Annals of Applied Biology. 137 (3): 223-235.
- Fiss M, Barckhausen O, Gherbawy Y, Kollar A, Hamamoto M, Auling G** (2003) Characterization of epiphytic yeasts of apple as potential biocontrol agents against apple scab (*Venturia inaequalis*). Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection. 110 (6): 513-523.
- Fokkema N J** (1991) The phyllosphere as an ecologically neglected milieu: A plant pathologist's point of view. S. 3-18 in *Microbial ecology of leaves*, Springer Verlag, New York.
- Forney L J, Zhou X, Brown C J** (2004) Molecular microbial ecology: Land of the one-eyed king. Current Opinion in Microbiology. 7: 210-220.
- Georgiou G, Lin S-C, Sharma M M** (1992) Surface-active compounds from microorganisms. Bio/Technology. 10: 60-65.
- Geyer U & Schönherr J** (1990) The effect of environment on permeability and composition of *Citrus* leaf cuticles: 1 Water permeability of isolated cuticular membranes. Planta. 180: 147-153.

- Hao M V, Brenner D J, Steigerwalt A G, Kosako Y, Komagata K** (1990) *Erwinia persicinus*, a new species isolated from plants. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 40 (4): 379-383.
- Hauke V & Schreiber L** (1998) Ontogenetic and seasonal development of wax composition and cuticular transpiration of ivy (*Hedera helix* L.) sun and shade leaves. *Planta*. 207: 67-75.
- Heuer H & Smalla K** (1997) Evaluation of community-level catabolic profiling using BIOLOG GN microplates to study microbial community changes in potato phyllosphere. *Journal of Microbiological Methods*. 30: 49-61.
- Heuer H & Smalla K** (1999) Bacterial phyllosphere communities of *Solanum tuberosum* L. and T4-lysozyme-producing transgenic variants. *FEMS Microbiology Ecology*. 28: 357-371.
- Hiraishi A, Furuhashi K, Matsumoto A, Koike K A, Fukuyama M, Tabuchi K** (1995) Phenotypic and genetic diversity of chlorine-resistant *Methylobacterium* strains isolated from various environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 61 (6): 2099-2107.
- Hirano S S & Upper C D** (1991) Bacterial community dynamics. S. 271-294 in *Microbial ecology of leaves*, Springer-Verlag, New York.
- Hirano S S & Upper C D** (2000) Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* - a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64 (3): 624-653.
- Holland M & Polacco J** (2000) A method for altering the metabolism of plant. Patent WO 00/60052, USA.
- Holland M, Long R L G, Polacco J** (2002) *Methylobacterium* spp.: Phylloplane bacteria involved in cross-talk with the plant help? S. 125-135 in *Phyllosphere microbiology*, The American Phytopathological Society, St. Paul.
- Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, Staley J T, Williams S T** (1994) *Bergey's manual of determinative bacteriology*. William & Wilkins, Baltimore.
- Hornschuh M, Grotha R, Kutschera U** (2002) Epiphytic bacteria associated with the bryophyte *Funaria hygrometrica*: Effects of *Methylobacterium* strains on protonema development. *Plant Biology*. 4: 682-687.

- Hugenholtz P & Fuerst J A** (1992) Heterotrophic bacteria in an air-handling system. *Applied and Environmental Microbiology*. 58 (12): 3914-3920.
- Ihsen J, Horn M A, Matthies C, Gößner A, Schramm A, Drake H L** (2003) N₂O-producing microorganisms in the gut of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* are indicative of ingested soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (3): 1655-1661.
- Isenegger D A, Taylor P W, Mullins K, McGregor G R, Barlass m, Hutchinson J F** (2003) Molecular detection of a bacterial contaminant *Bacillus pumilis* in symptomless potato plant tissue cultures. *Plant Cell Reports*. 8: 814-820.
- Jacobs J L & Sundin G W** (2001) Effect of solar UV-B radiation on a phyllosphere bacterial community. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (12): 5488-5496.
- Jacques M-A & Morris C E** (1995) A review of issues related to the quantification of bacteria from the phyllosphere. *FEMS Microbiology Ecology*. 18: 1-14.
- Jenks M A & Ashworth E N** (1999) Plant epicuticular waxes: Function, production and genetics. S. 1-68 in *Horticultural Reviews*, John Willey & Sons, Inc., New York.
- Jetter R, Schäffer S, Riederer M** (2000) Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: Evidence from *Prunus laurocerasus* L. *Plant, Cell and Environment*. 23: 619-628.
- Jetter R & Schäffer S** (2001) Chemical composition of the *Prunus laurocerasus* leaf surface. Dynamic changes of the epicuticular wax film during leaf development . *Plant Physiology*. 126: 1725-1737.
- Jones J B, Bouzar H, Stall R E, Almira E C, Roberts P D, Bowen B W, Sudberry J, Strickler P M, Chun J** (2000) Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50: 1211-1219.
- Joshi J & Holland M** (1999) Methods for treating plants. Patent 5,961,687, USA.
- Juniper B E** (1991) The leaf from the inside and the outside: A microbe's perspective. S. 21-42 in *Microbial Ecology of Leaves*, Springer Verlag, New York.

- Jurkevitch E J & Shapira G** (2000) Structure and colonization dynamics of epiphytic bacterial communities and of selected component strains on tomato (*Lycopersicon esculentum*) leaves. *Microbial Ecology*. 40: 300-308.
- Kalyaeva M A, Zacharchenko N S, Doronina N V, Rukavtsova E B, Ivanova E G, Alekseeva V V, Trotsenko Y A, Bur'yanov Y I** (2001) Plant growth and morphogenesis *in vitro* is promoted by associative methylophilic bacteria. *Russian Journal of Plant Physiology*. 48 (4): 514-517.
- Kinkel L L** (1997) Microbial population dynamics on leaves. *Annual Review of Phytopathology*. 35: 327-347.
- Kirsch T, Kaffarnik F, Riederer M, Schreiber L** (1997) Cuticular permeability of the three tree species *Prunus laurocerasus* L., *Ginkgo biloba* L. and *Juglans regia* L.: Comparative investigation of the transport properties of intact leaves, isolated cuticles and reconstituted cuticular waxes. *Journal of Experimental Botany*. 48 (310): 1035-1045.
- Knoll D & Schreiber L** (1998) Influence of epiphytic micro-organisms on leaf wettability: Wetting of the upper leaf surface of *Juglans regia* and of model surfaces in relation to colonization by micro-organisms. *New Phytologist*. 140: 271-282.
- Knoll D & Schreiber L** (2000) Plant-microbe interactions: Wetting of ivy (*Hedera helix* L.) leaf surfaces in relation to colonisation by epiphytic microorganisms. *Microbial Ecology*. 41: 33-42.
- Köhler W, Schachtel G, Voleske P** (2002) *Biostatistik*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Krimm U** (2001) Untersuchungen zur epiphyllen Mikroflora in der Phyllosphäre von *Fragaria ananassa* cv. Elsanta. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Kucheryava N, Fiss M, Auling G, Kroppenstedt R M** (1999) Isolation and characterization of epiphytic bacteria from the phyllosphere of apple, antagonistic *in vitro* to *Venturia inaequalis*, the causal agent of apple scab. *Systematic and Applied Microbiology*. 22: 472-478.
- Larcher W** (1994) *Ökophysiologie der Pflanzen*. Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Leefflang P & Smit E** (1997) Use of ExpandTM PCR system to amplify the 16S ribosomal genes for the characterization of bacterial communities in soil. *Biochemica*. 1: 16-18.

- Legard D E, McQuilken M P, Whipps J M, Fenlon J S, Fermor T R, Thompson I P, Bailey M J, Lynch J M** (1994) Studies of seasonal changes in the microbial populations on the phyllosphere of spring wheat as a prelude to the release of a genetically-modified micro-organism. *Agriculture Ecosystems & Environment*. 50 (2): 87-101.
- Leveau J H J & Lindow S E** (2001) Appetite of an epiphyte: Quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. *Proceedings of the National Academy of Science*. 98 (6): 3446-3453.
- Leveau J H J & Lindow S E** (2002) Bioreporters in microbial ecology. *Current Opinion in Microbiology*. 5: 259-265.
- Lim Y W, Baik K S, Han S K, Kim S B, Bae K S** (2003) *Burkholderia sordidicola* sp. nov., isolated from the white-rot fungus *Phanerochaete sordida*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53: 1631-1636.
- Lindow S E & Leveau J H J** (2002) Phyllosphere microbiology. *Current Opinion in Biotechnology*. 13: 238-243.
- Lindow S E & Brandl M T** (2003) Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (4): 1875-1883.
- Loper J E & Lindow S E** (1994) A biological sensor for iron available to bacteria in their habitats on plant surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. 60 (6): 1934-1941.
- Lüttge U, Kluge M, Bauer G** (1994) Botanik. VCH Verlagsgesellschaft GmbH, Weinheim.
- Madigan M T, Martinko J M, Parker J** (2000) Brock biology of microorganisms. Prentice Hall Inc., Upper Saddle River.
- Magalhaes Cruz L, Maltempi de Souza E, Baler Weber O, Ivo Baldani J, Döbereiner J, de Oliveira Pedrosa F** (2001) 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (5): 2375-2379.
- McSpadden Gardner B B & Weller D M** (2001) Changes in populations of rhizosphere bacteria associated with take-all disease of wheat. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (10): 4414-4425.

- Mergaert J, Hauben L, Cnockaert M C, Swings J** (1999) Reclassification of non-pigmented *Erwinia herbicola* strains from trees as *Erwinia billingiae* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology. 49: 377-383.
- Mocali S, Bertelli E, di Cello F, Mengoni A, Sfalanga A, Viliani F, Caciotti A, Tegli S, Surico G, Fani R** (2003) Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. Research in Microbiology. 154 (105): 114-
- Monier J-M & Lindow S E** (2003) Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregate formation on leaf surfaces. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 100 (26): 15977-15982.
- Morris C E, Monier J-M, Jacques M-A** (1997) Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. Applied and Environmental Microbiology. 63 (4): 1570-1576.
- Morris C E, Monier J-M, Jacques M-A** (1998) A technique to quantify the populations size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere. Applied and Environmental Microbiology. 64 (12): 4789-4795.
- Morris C E & Kinkel L L** (2002) Fifty years of phyllosphere microbiology: Significant contributions to research in related fields. S. 365-375 in *Phyllosphere microbiology*, The American Phytopathological Society, St. Paul.
- Müller T, Müller M, Behrendt U, Stadler B** (2003) Diversity of culturable phyllosphere bacteria on beech and oak: The effects of lepidopterous larvae. Microbiological Research. 158: 291-297.
- Nemecek-Marshall M, MacDonald R C, Franzen J J, Wojciechowski C L, Fall R** (1995) Methanol emission from leaves (enzymatic detection of gas-phase methanol and relation of methanol fluxes to stomatal conductance and leaf development). Plant Physiology. 108 (4): 1359-1368.
- Niederl S, Kirsch T, Riederer M, Schreiber L** (1998) Co-permeability of ^3H -labeled water and ^{14}C -labeled organic acids across isolated plant cuticles. Plant Physiology. 116: 117-123.
- Ott E-M, Müller T, Franz C M A P, Ulrich A, Gabel M, Seyfarth W** (2001) Population dynamics and antagonistic potential of enterococci colonizing the phyllosphere of grasses. Journal of Applied Microbiology. 91: 54-66.

- Padaga M, Heard G M, Paton J E, Fleet G H** (2000) Microbial species associated with different sections of broccoli harvested from three regions in Australia. *International Journal of Food Microbiology*. 60: 15-24.
- Pati B R & Chandra A K** (1993) Diazotrophic bacterial populations and other associated organisms on the phyllosphere of some crop plants. *Zentralblatt Mikrobiologie*. 148: 392-402.
- Pedgley D E** (1991) Aerobiology: The atmosphere as a source and sink for microbes. S. 43-59 in *Microbial ecology of leaves*, Springer Verlag, New York, Inc., New York.
- Peix A, Rivas R, Mateos P, Martinez-Molina E, Rodriguez-Barrueco C, Velazquez E** (2003) *Pseudomonas rhizosphaerae* sp. nov., a novel species that actively solubilizes phosphate *in vitro*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53: 2067-2072.
- Peix A, Rivas R, Santa-Regina I, Mateos P, Martinez-Molina E, Rodriguez-Barrueco C, Velazquez E** (2004) *Pseudomonas lutea* sp. nov., a novel phosphate solubilizing bacterium isolated from the rhizosphere of grasses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54: 847-850.
- Perello A, Simon M R, Arambarri A M** (2002) Interactions between foliar pathogens and the saprophytic microflora of the wheat (*Triticum aestivum* L.) phylloplane. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift*. 150 (4-5): 232-243.
- Polacco J & Holland M** (1993) Method of altering the metabolism of a plant. Patent 5,268,171, USA.
- Prasad R B N & Gülz P-G** (1990) Surface waxes from leaves and fruits of walnut. *Phytochemistry*. 29 (7): 2097-2099.
- Riederer M & Schönherr J** (1990) Effects of surfactants on water permeability of isolated plant cuticles and on the composition of their cuticular waxes. *Pesticide Science*. 29: 85-94.
- Riederer M** (1991) Die Kutikula als Barriere zwischen terrestrischen Pflanzen und der Atmosphäre. *Naturwissenschaften*. 78: 201-208.
- Riederer M & Schreiber L** (2001) Protecting against water loss: Analysis of the barrier properties of plant cuticles. *Journal of Experimental Botany*. 52 (363): 2023-2032.

- Rivas R, Abril A, Trujillo M E, Velazquez E** (2004) *Sphingomons phyllosphaerae* sp. nov., from the phyllosphere of *Acacia caven* in Argentina. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 54: 2147-2150.
- Romanovskaya V A, Stolyar S M, Malashenko Y R, Dodatko T N** (2001) The ways of plant colonization by *Methylobacterium* strains and properties of these bacteria. Microbiology. 70 (2): 221-227.
- Sambrook J & Russel D W** (2001) Molecular cloning - a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Schönherr J & Lenzian K J** (1981) A simple and inexpensive method of measuring water permeability of isolated plant cuticular membranes. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie. 102: 321-327.
- Schönherr J & Baur P** (1996) Cuticle permeability studies: A model for estimating leaching of plant metabolites to leaf surfaces. S. 1-23 in *Aerial Plant Surface Microbiology*, Plenum Press, New York.
- Schreiber L, Bach S, Kirsch T, Knoll D, Scholz K, Riederer M** (1995) A simple photometric device analysing cuticular transport physiology: Surfactant effect on permeability of isolated cuticular membranes of *Prunus laurocerasus* L. Journal of Experimental Botany. 46 (293): 1915-1921.
- Schreiber L & Riederer M** (1996) Ecophysiology of cuticular transpiration: Comparative investigation of cuticular water permeability of plant species from different habitats. Oecologia. 107: 426-432.
- Schreiber L** (2001) Effect of temperature on cuticular transpiration of isolated cuticular membranes and leaf discs. Journal of Experimental Botany. 52 (362): 1893-1900.
- Schreiber L, Skrabs M, Hartmann K, Diamantopoulos P, Simanova E, Santrucek J** (2001) Effect of humidity on cuticular water permeability of isolated cuticular membranes and leaf disks. Planta. 214: 274-282.
- Schreiber L, Krimm U, Knoll D, Sayed M, Auling G, Kroppenstedt R M** (2005) Plant-microbe interactions: Identification of epiphyllic bacteria and their effects on barrier properties of isolated cuticles . New Phytologist. in Druck-

- Schröder D, Deppisch H, Obermayer M, Krone G, Stackebrandt E, Hölldobler B, Goebel W, Gross R** (1996) Intracellular endosymbiotic bacteria of *Camponotus* species (carpenter ants): Systematics, evolution and ultrastructural characterization. *Molecular Microbiology*. 21 (3): 479-489.
- Sebastian J, Chandra A K, Kolattukudy P E** (1987) Discovery of a cutinase-producing *Pseudomonas* sp. cohabiting with an apparently nitrogen-fixing *Corynebacterium* sp. in the phyllosphere. *Journal of Bacteriology*. 169 (1): 131-136.
- Senghas K & Seybold S** (2000) Flora von Deutschland und angrenzender Länder. Ein Buch zum Bestimmen der wildwachsenden und häufig kultivierten Gefäßpflanzen / Schmeil - Fitch. Quelle & Meyer Verlag, Wiebelsheim.
- Sly L I, Cox T L, Beckenham T B** (1999) The phylogenetic relationships of *Caulobacter*, *Asticcacaulis* and *Brevundimonas* species and their taxonomic implications. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49: 483-488.
- Stammitti L, Garrec J-P, Derredj S** (1995) Permeability of isolated cuticles of *Prunus lauro-cerasus* to soluble carbohydrate. *Plant Physiology and Biochemistry*. 33 (3): 319-326.
- Stromberg K D, Kinkel L L, Leonard K J** (2000) Interactions between *Xanthomonas translucens* pv. *translucens*, the causal agent of bacterial leaf streak of wheat, and bacterial epiphytes in the wheat phyllosphere. *Biological Control*. 17: 61-72.
- Sundin G W & Jacobs J L** (1999) Ultraviolet radiation (UVR) sensitivity analysis and UVR survival strategies of a bacterial community from the phyllosphere of field-grown peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Microbial Ecology*. 38: 27-38.
- Tanprasert P & Reed B M** (1998) Detection and identification of bacterial contaminants of strawberry runner explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 52: 53-55.
- Theoduluz C, Vega A, Salazar M, Gonzalez E, Meza-Basso L** (2003) Expression of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin *cryIAb* gene in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* strains that naturally colonize the phylloplane of tomato plants (*Lycopersicon esculentum*, Mills). *Journal of Applied Microbiology*. 94: 375-381.
- Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J** (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22 (22): 4673-4680.

- Trotsenko Y A, Ivanova E G, Doronina N V** (2001) Aerobic methylophilic bacteria as photo-symbionts. *Microbiology*. 70 (6): 623-632.
- Vaneechoutte M, de Beenhouwer H, Claey s G, Verschraegen G, de Rouck A, Paepe N, Elaichouni A, Portaels F** (1993) Identification of *Mycobacterium* species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 31 (8): 2061-2065.
- Weidner S, Arnold W, Stackebrandt E, Pühler A** (2000) Phylogenetic analysis of bacterial communities associated with leaves of the seagrass *Halophila stipulacea* by a culture-independent small-subunit rRNA gene approach. *Microbial Ecology*. 39: 22-31.
- Williams M M, Domingo J W, Meckes M C, Kelty C A, Rochon H S** (2004) Phylogenetic diversity of drinking water bacteria in a distribution system simulator. *Journal of Applied Microbiology*. 5: 954-964.
- Yadav R K P, Halley J M, Karamanoli K, Constantinidou H-I, Vokou D** (2004) Bacterial populations on the leaves of mediterranean plants: Quantitative features and testing of distribution models. *Environmental and Experimental Botany*. 52: 63-77.
- Yang D-H, Crowley D E, Borneman J, Keen N T** (2001) Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *Proceedings of the National Academy of Science*. 98 (7): 3889-3894.
- Yuen G Y, Steadman J R, Lindgren D T, Schaff D, Jochum C** (2001) Bean rust biological control using bacterial agents. *Crop Protection*. 20 (5): 395-402.

6.2 Quellen aus dem Internet

BLAST auf der Interentseite des NCBI – National center for biotechnology information.

URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

ClustalW. URL: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>

Comparative RNA web site. URL: <http://www.rna.icmb.utexas.edu/>

Meteorologisches Institut der Universität Bonn. URL: <http://www.meteo.uni-bonn.de>

NCBI – National center for biotechnology information. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

PHYLIP. URL: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>

The Prokaryotes – An evolving resource for the microbial community.

URL: <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>

6.3 Abkürzungen

Kürzel	Bedeutung
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis, dt. Restriktionsanalyse der ribosomalen DNA
bp	base pair, dt. Basenpaar
CFU	Colony forming unit, dt. Koloniebildende Einheit
CM	Cuticular membrane, dt. Kutikularmembran
DNA	Desoxyribonucleic acid, dt. Desoxyribonukleinsäure
ds / ssDNA	double strand / single strand, dt. doppelsträngig / einzelsträngig DNA, gilt analog für RNA
DPM	Divisions per minute, dt. Zerfälle pro Minute, Maßeinheit für Radioaktivität; (1DPM = 60 Bq)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Erdbeschleunigung; 9.81 m s^{-2}
GC/FID	Gaschromatograph / Flammenionisationsdetektor
GC/MS	Gesachromatograph / Massenspektroskop
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GFPB	grün fluoreszierendes Protein exprimierendes Bakterium (Bioreporter)
LB-Medium	Louria Bertani-Medium
LD	Leaf disk, dt. Blattscheibe
min	Minute
PBS	Phosphorous buffered solution, dt. Phosphorpuffer
PCR	Polymerase chain reaction, dt. Polymerasekettenreaktion
RF	Relative Luftfeuchte
RNA	Ribonucleic acid, dt. Ribonukleinsäure
RPM	Rounds per minute, dt. Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
SEM	Scanning electron microscope, dt. Rasterelektronenmikroskop
TAE	Trisacetat-Elektrophorese-Puffer
TSA	Tryptischer Soja Agar
U	Unit, dt. Einheit (bei Enzymen)

6.4 Abbildungen

Abbildung 1 Schematische Darstellung verschiedener hypothetischer Bakterien – Habitat Modifikationen in der Phyllosphäre	4
Abbildung 2 Einsatz von Bakterien im biologischen Pflanzenschutz	5
Abbildung 3 Querschnitt einer Transpirationskammer	8
Abbildung 4 Versuchsanordnung für die Transpirationsmessung mittels radioaktiv markiertem Wasser	8
Abbildung 5 Versuchsanordnung: Beeinflussung der Permeabilität durch Applikation von Substanzen	9
Abbildung 6 Permeationskammer	10
Abbildung 7 Effekte der Inokulation von <i>Hedera</i> -CM mit verschiedenen Bakterienstämmen	18
Abbildung 8 Vergleich der Effekte Inokulation (E1) und Spülen (E3) auf <i>Hedera</i> -CM	19
Abbildung 9 Effekte der Behandlung von <i>Prunus</i> -CM mit verschiedenen Inokula	21
Abbildung 10 Vergleich der Effekte Inokulation (E1) und Spülen (E3) auf <i>Prunus</i> -CM	21
Abbildung 11 Effekte der Behandlung von <i>Fragaria</i> -Blattscheiben mit gewaschenen Zellen von <i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> und deren Kulturüberstand	22
Abbildung 12 Vergleich DAPI und GFP	23
Abbildung 13 Vergleich Acridinorange mit GFP	24
Abbildung 14 Fruktosepermeation über <i>Juglans</i> -CM (I)	24
Abbildung 15 Fruktosepermeation über <i>Juglans</i> -CM (II)	26
Abbildung 16 Fruktoseverfügbarkeit auf der Blattoberseite von <i>Juglans</i>	27
Abbildung 17 Flussdiagramm für drei <i>Prunus</i> -CM bei zwei Fruktose-Konzentrationen	28
Abbildung 18 Leitwerte für Wasser und Fruktose bei drei Fruktosekonzentrationen	29
Abbildung 19 Flussdiagramm, <i>Hedera</i> -CM vor und nach Inokulation mit <i>Pseudomonas</i> sp. (SaU7)	31
Abbildung 20 Flussdiagramm von $^3\text{H}_2\text{O}$ über <i>Hedera</i> -CM, Auswirkung der Inokulation mit Bakterien und anschließendem Spülen der CM	32
Abbildung 21 Funktionsweise des Bioreproters <i>Eh299R46</i>	35
Abbildung 22 Permeable Bereiche bei verschiedenen Arten	36
Abbildung 23 Prozentuale Häufigkeitsverteilung der Leitwerte für Fruktose vor (A) und nach (B) log-Transformation	37
Abbildung 24 Fruktose-Leitwerte im Vergleich zu Wasserleitwerten	38
Abbildung 25 Fruktose-Leitwerte im Vergleich zueinander	38
Abbildung 26 Zusammenhang zwischen der Fruktosekonzentration im Donor und dem gemessenen Leitwert	39
Abbildung 27 <i>Juglans regia</i> L.	41
Abbildung 28 Populationsdichten auf 6 verschiedenen Blätter von <i>Ilex aquifolium</i> L. nach Kultivierung auf verschiedenen Medien	43
Abbildung 29 Populationsdichten nach Kultivierung auf verschiedenen Medien	43

Abbildung 30 Populationsdichten im Verlauf der Vegetationsperiode	51
Abbildung 31 Gelanalyse mit LabImage®	54
Abbildung 32 Stammbaum aus der Fragmente-Matrix	55
Abbildung 33 Stammbaum der γ -Proteobacteria	56
Abbildung 34 Stammbaum aller Arten ohne γ -Proteobacteria	57
Abbildung 35 Stammbaum aus Sequenzen	58
Abbildung 36 Typenverteilung während der Vegetationsperiode	61
Abbildung 37 REM-Aufnahmen 16. Mai 2003 (P2)	63
Abbildung 38 REM-Aufnahmen 13. Juni 2003 (P3)	65
Abbildung 39 REM-Aufnahmen 18. Juli 2003 (P5)	66
Abbildung 40 REM-Aufnahmen 14. August 2003 (P6)	69
Abbildung 41 REM-Aufnahmen 16. September 2003 (P7)	69
Abbildung 42 REM-Aufnahmen 14. Oktober 2003 (P8)	70
Abbildung 43 Biofilme auf <i>Juglans regia</i> L., Juni 2003	71
Abbildung 44 Flussdiagramm <i>Juglans regia</i> - Blattscheiben, September 2003	72
Abbildung 45 Wasserpermeabilität von <i>Juglans</i> -Blattscheiben	73
Abbildung 46 Wachszusammensetzung in $\mu\text{g cm}^{-2}$ aufgeschlüsselt nach Substanzklassen im jahreszeitlichen Verlauf	75
Abbildung 47 Wachszusammensetzung in Prozent aufgeschlüsselt nach Substanzklassen im jahreszeitlichen Verlauf	75
Abbildung 48 Saisonale Entwicklung der Kettenlängenverteilung innerhalb der Substanzklassen Alkohole, Alkane und Säuren	76
Abbildung 49 Saisonale Entwicklung der Kettenlängenverteilung innerhalb der Substanzklasse der Ester	77
Abbildung 50 Bevorzugte Biofilm-Lokalisationen	101
Abbildung 51 Details von Biofilmen	101
Abbildung 52 Zusammenhang zwischen dem Wasserwiderstandes (1/P) von <i>Juglans</i> -Blattscheiben und der Wachsbelegung im Saisonverlauf	103
Abbildung 53 Korrelation des Wasserwiderstandes (1/P) von <i>Juglans</i> -Blattscheiben und der Wachsbelegung	104
Abbildung 54 Fragmente-Matrix	II
Abbildung 55 Kolonien vom 12. 5. (P1)	III
Abbildung 56 Kolonien vom 16. 5. (P2)	III
Abbildung 57 Kolonien vom 10. 6. (P3)	IV
Abbildung 58 Kolonien vom 16. 6. (P4)	IV
Abbildung 59 Kolonien vom 19. 7. (P5)	V
Abbildung 60 Kolonien vom 24. 9. (P7)	V
Abbildung 61 Referenzstämme der Typen	VII
Abbildung 62 Sekundärstruktur der 16S rDNA	XIII

6.5 Tabellen

Tabelle 1 Filter für die Epifluoreszenzmikroskopie	16
Tabelle 2 Medien für die Evaluierung der maximalen CFU-Bildung	42
Tabelle 3 Restriktionsenzyme	45
Tabelle 4 PCR-Programm	46
Tabelle 5 Temperaturprogramm der GC/FID und GC/MS Analysen	50
Tabelle 6 Mittlere Populationsdichte auf <i>Juglans regia</i> L. zu verschiedenen Zeitpunkten	52
Tabelle 7 Übersicht über die Probennahmen	53
Tabelle 8 BLAST-Ergebnisse	59
Tabelle 9 Wachsbelegung und –Zusammensetzung im jahreszeitlichen Verlauf	74
Tabelle 10 Übersicht über bisher von Pflanzen isolierte Bakterien	86
Tabelle 11 Fragmente für <i>AluI</i>	I
Tabelle 12 Fragmente für <i>TaqI</i>	I
Tabelle 13 Fragmente für <i>RsaI</i>	I
Tabelle 14 Fragmente für <i>BsuRI</i>	I
Tabelle 15 Typenübersicht	VI
Tabelle 16 Populationsdichten	XII

7 ANHANG

7.1 ARDRA

7.1.1 Fragmentmuster und Fragmente-Matrix

Tabelle 11 Fragmente für *AluI*

Muster	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Fragmente	580	580	620	640	440	410	420	430	620	650	580	440	400	610	460	250	370	450	440
	380	380	220	240	270	210	250	270	450	450	390	370	240	270	390	240	240	430	400
	220	220	170	220	220	160	210	210	150	190	230	220	210	240	220	210	210	130	380
	170	100	90	190	200	90	170	190		100	200	170	160	220		140	180		150
	90						150	100			100	90	140	190					
90																			

Tabelle 12 Fragmente für *TaqI*

Muster	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Fragmente	800	470	420	920	880	780	900	520	790	590	590	560	520	920	870	530	660
	360	360	360	370	360	540	550	490	550	360	380	360	360	300	210	370	540
	190	190	190	180	190	130	90	320	500	190	350	310	310	190	190	330	190
	100	90	90	90							190	190			150	190	

Tabelle 13 Fragmente für *RsaI*

Muster	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Fragmente	490	510	630	490	890	500	910	780	830	810	870	420	410	500	880	500	520	510	510
	410	460	510	410	360	450	360	360	360	360	360	410	360	420	360	480	500	310	310
	340	430	460			400						250	250	410		410	420	260	190
		110	430														260	110	110
																	110		

Tabelle 14 Fragmente für *BsuRI*

Muster	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Fragmente	320	520	580	310	600	930	690	330	600	610	280	460	490	460	460	790	460
	220	280	460	270	460	330	220	280	460	470	190	330	280	280	210	590	290
	210	220	320	170	240	270	170	260	310	320	120	300	180	180	120	250	280
	170	180		150	170	240	120	180	250			220		160		220	170
	120	140		120		190		90	120					120		130	120

[illegible]

Abbildung 54 Fragmente-Matrix

Kombination der Fragmente aus dem Verdau mit den vier Enzymen *AluI*, *BsuRI*, *RsaI*, *TaqI*. + steht für das Vorhandensein eines Fragmentes, - für das Fehlen. Aus dieser Matix wurde der Stammbaum (Abbildung 32) berechnet.

7.1.2 Übersicht über die Probennahmen

Probennahme 1, 12.05.2003

Von P1 wurden 21 Kolonien selektiert (Abbildung 55). Für 61.90 % dieser Kolonien konnte ausreichend PCR-Produkt für die Restriktionsanalyse mit allen vier Enzymen gewonnen werden und somit 54.93 % der Gesamtbakterien dieser Probennahme typisiert werden. Für die Kolonien 2, 4, 6, 10, 15 – 17 und 20 konnte kein, oder nicht ausreichend PCR-Produkt für eine Restriktionsanalyse gewonnen werden.

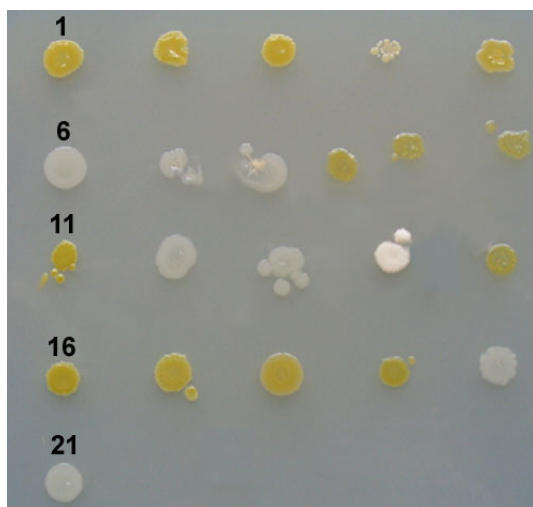


Abbildung 55 Kolonien vom 12. 5. (P1)

Die Kolonien sind von 1 – 21 nummeriert. Die Kolonien wurden bei 28 °C auf 10 % TSA für 48 h bebrütet und anschließend für 24 bei 4 °C gelagert. Die Kolonien 3, 8, 9, 11 und 19 zeigten die Verdaumuster vom Typ 1; Kolonie 1 Typ 2; Kolonie 5 Typ 3; Kolonie 18 Typ 4; die Kolonien 12, 13 und 21 Typ 8; Kolonie 7 Typ 9; Kolonie 14 Typ 14.

Probennahme 2, 16.05.2003

Von P2 wurden 30 Kolonien selektiert (Abbildung 56). Für 90.00 % dieser Kolonien konnte ausreichend PCR-Produkt für die Restriktionsanalyse mit allen vier Enzymen gewonnen werden und somit 93.16 % der Gesamtbakterien dieser Probennahme typisiert werden. Für die Kolonien 9, 19 und 21 konnte kein PCR-Produkt erzielt werden.

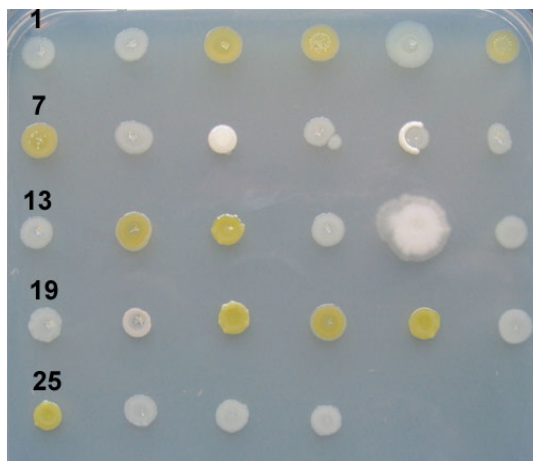


Abbildung 56 Kolonien vom 16. 5. (P2)

Die Kolonien sind von 1 – 30 nummeriert. Die Kolonien wurden bei 28 °C auf 10 % TSA für 48 h bebrütet und anschließend für 24 bei 4 °C gelagert. Bei der Kolonie 11 handelt es sich nicht um eine Reinkultur. Die Stämme 29 und 30 ließen sich nicht weiter kultivieren.

Die Kolonien 11, 23 und 24 zeigten Verdaumuster vom Typ 1; die Kolonien 3 – 4, 7, 14 und 22 Typ 4; die Kolonien 8 und 29 Typ 5; Kolonie 6 Typ 6; die Kolonien 1 – 2, 10, 12 – 16, 18, 24 und 26 – 28 Typ 8; Kolonie 5 Typ 11; Kolonie 17 Typ 12; die Kolonien 20 und 30 Typ 13.

Probennahme 3, 10.06.2003

Von P3 wurden 30 Kolonien selektiert (Abbildung 57). Für 83.33 % dieser Kolonien konnte ausreichend PCR-Produkt für die Restiktionsanalyse mit allen vier Enzymen gewonnen werden und somit 89.35 % der Gesamtbakterien dieser Probennahme typisiert werden. Da die Populationsdichte von Blatt 2 ca. 20000fach höher war als für die beiden anderen Blätter, und die Verteilung der verschiedenen Stämme ähnlich, wurde es für die Berechnung des prozentualen Anteils an den Gesamtbakterien nicht berücksichtigt. Für die Kolonien 13, 16, 27, 28 und 30 konnte kein PCR-Produkt erzielt werden.

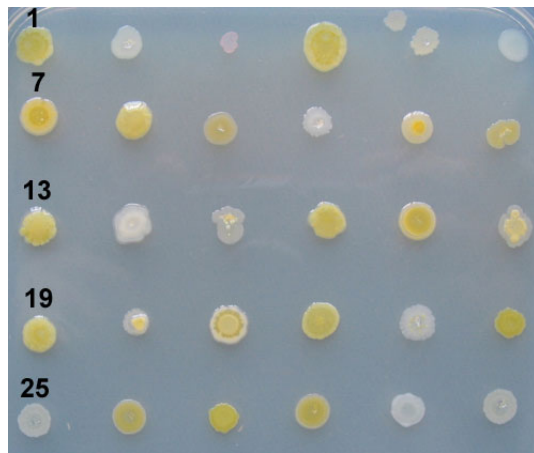


Abbildung 57 Kolonien vom 10. 6. (P3)

Die Kolonien sind von 1 – 30 nummeriert. Die Kolonien wurden bei 28 °C auf 10 % TSA für 48 h bebrütet und anschließend für 24 bei 4 °C gelagert

Die Kolonien 1, 4, 8, 19, 22 und 24 zeigten Verdauemuster vom Typ 1; die Kolonien 7, 11, 17, 21 und 26 Typ 4; die Kolonien 2, 6, 23 und 29 Typ 8; Kolonie 9 Typ 10; Kolonie 12 Typ 15; Kolonie 3 Typ 20; Kolonie 5 Typ 22; Kolonie 10 Typ 23; die Kolonien 14 und 20 Typ 24; die Kolonien 15 und 18 Typ 25; Kolonie 25 Typ 26.

Probennahme 4, 16.06.2003

Von P4 wurden 15 Kolonien selektiert (Abbildung 58). Für 60.00 % dieser Kolonien konnte ausreichend PCR-Produkt für die Restiktionsanalyse mit allen vier Enzymen gewonnen werden und somit 51.22 % der Gesamtbakterien dieser Probennahme typisiert werden. Für die Kolonien 1, 6 – 7 und 10 - 12 konnte kein PCR-Produkt erzielt werden.

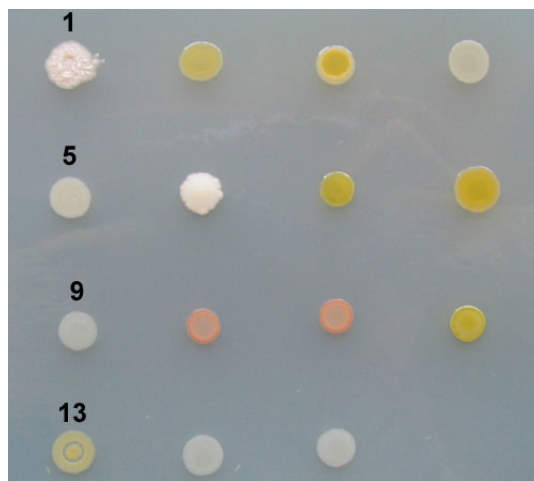


Abbildung 58 Kolonien vom 16. 6. (P4)

Die Kolonien sind von 1 – 15 nummeriert. Die Kolonien wurden bei 28 °C auf 10 % TSA für 48 h bebrütet und anschließend für 24 bei 4 °C gelagert.

Die Kolonien 3, 8 und 13 zeigten Verdauemuster vom Typ 4; die Kolonien 14 und 15 Typ 7; die Kolonie 9 Typ 8; die Kolonie 2 Typ 16; Kolonie 4 Typ 18; Kolonie 5 Typ 19.

Probennahme 5, 15.07.2003

Von P5 wurden 27 Kolonien selektiert (Abbildung 59). Für 37.04 % dieser Kolonien konnte ausreichend PCR-Produkt für die Restriktionsanalyse mit allen vier Enzymen gewonnen werden und somit 37.65 % der Gesamtbakterien dieser Probennahme typisiert werden. Für die Kolonien 2 - 3, 5 - 7, 9 - 10, 13 - 14, 16 - 17, 20 - 21, 23 - 24 und 26, 27 konnte kein oder nicht ausreichend PCR-Produkt für eine Restriktionsanalyse erzielt werden.

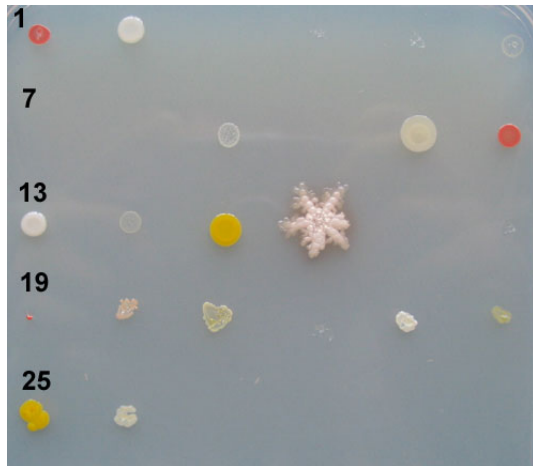


Abbildung 59 Kolonien vom 19. 7. (P5)

Die Kolonien sind von 1 – 27 nummeriert. Die Kolonien wurden bei 28 °C auf 10 % TSA für 48 h bebrütet und anschließend für 24 bei 4 °C gelagert. Kolonien dieser Probennahme ließen sich nur schlecht (6, 9, 14, 19 und 24) oder gar nicht (3 – 5, 7 – 8, 10, 17 – 18, 22 und 27) weiter kultivieren.

Die Kolonien 4, 11 und 18 zeigten Verdauemuster vom Typ 28; Kolonie 25 Typ 29; Kolonie 1 Typ 30; die Kolonien 12 und 19 Typ 31; Kolonie 15 Typ 32; Kolonie 8 Typ 35; Kolonie 22 Typ 36.

Probennahme 7, 24.09.2003

Von P7 wurden 20 Kolonien selektiert (Abbildung 60). Für 55.00 % dieser Kolonien konnte ausreichend PCR-Produkt für die Restriktionsanalyse mit allen vier Enzymen gewonnen werden und somit 38.96 % der Gesamtbakterien dieser Probennahme typisiert werden. Für die Kolonien 5, 10 – 12, 13 – 16, 18 und 20 konnte kein PCR-Produkt erzielt werden.

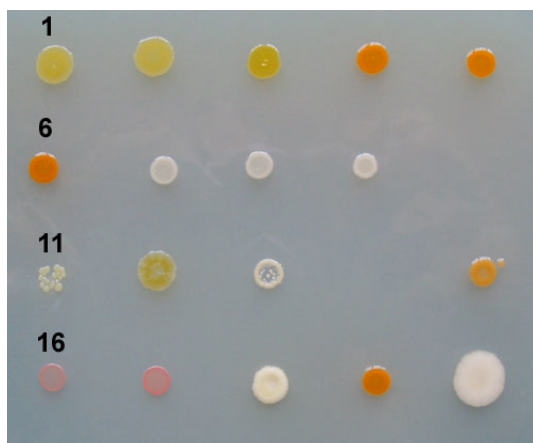


Abbildung 60 Kolonien vom 24. 9. (P7)

Die Kolonien sind von 1 – 20 nummeriert. Die Kolonien wurden bei 28 °C auf 10 % TSA für 48 h bebrütet und anschließend für 24 bei 4 °C gelagert. Die Kolonien 10 und 14 ließen sich nicht weiter kultivieren.

Die Kolonie 12 zeigte die Verdauemuster vom Typ 10; die Kolonien 1 und 2 Typ 17; Kolonie 17 Typ 21; Kolonie 3 Typ 27; die Kolonien 4, 6 und 19 Typ 33; die Kolonien 7 – 9 Typ 34.

7.1.3 Zusammenfassende Beschreibung der Typen

Tabelle 15 Typenübersicht

Die Typen ergeben sich aus der Kombination der vier Verdauemuster. Angegeben sind die Referenzkolonie (Abbildung 61), deren Farbe, die Fragmentmuster der vier Enzyme und Anzahl der Kolonien eines Typs, die für die Typisierung bei allen Probenahmen selektiert wurden.

Typ	Kolonie	Farbe	<i>AluI</i>	<i>TaqI</i>	<i>RsaI</i>	<i>BsuRI</i>	n
1	P1/11	gelb	1	1	1	2	14
2	P1/1	gelb	1	1	1	4	1
3	P1/5	gelb	1	2	2	2	1
4	P3/26	gelb	1	2	2	4	14
5	P2/8	weiß	1	3	2	1	2
6	P2/6	gelb	2	2	2	4	1
7	P4/15	weiß	2	3	1	1	2
8	P1/12	weiß	2	3	2	1	20
9	P1/7	weiß	2	3	3	1	1
10	P7/12	gelb	3	1	7	7	2
11	P2/5	weiß	3	5	5	7	1
12	P2/17	weiß	3	6	1	3	1
13	P2/20	weiß	4	7	6	5	2
14	P1/14	weiß	5	4	4	10	1
15	P3/12	gelb	6	1	7	7	1
16	P4/2	gelb	6	1	11	7	1
17	P7/1	gelb	6	1	15	7	2
18	P4/4	beige	7	4	10	7	1
19	P4/5	weiß	8	4	17	9	1
20	P3/3	rosa	9	8	2	11	1
21	P7/17	rosa	9	8	1	11	1
22	P3/5	hellgelb	10	9	1	6	1
23	P3/10	weiß	11	10	2	1	1
24	P3/20	gelb	12	11	8	8	2
25	P3/15	beige	13	4	9	7	2
26	P3/25	beige	13	5	11	7	1
27	P7/3	dunkelgelb	13	13	13	16	1
28	P5/11	beige	14	4	16	12	3
29	P5/25	sonnengelb	14	5	12	14	1
30	P5/11	rot	15	12	14	11	1
31	P5/12	rot	15	15	14	11	2
32	P5/15	sonnengelb	16	5	12	14	1
33	P7/4	orange	16	14	14	17	3
34	P7/9	weiß	17	13	16	12	3
35	P5/8	rosa	18	5	18	13	1
36	P5/22	weiß	19	16	19	15	1

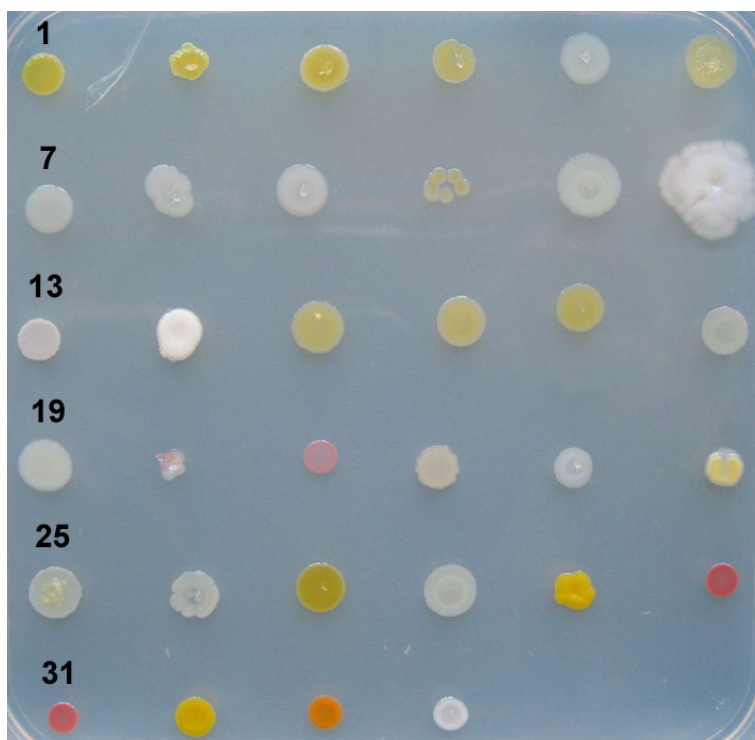


Abbildung 61 Referenzstämme der Typen

Die Kolonien wurden von Glyzerinkulturen auf 10 % TSA angezogen, bei 28 °C für 48 bebrütet und anschließend für 24 h bei 4 °C gelagert. Die Typen 35 und 36 ließen sich nicht mehr kultivieren. Bei Typ 20 liegt offensichtlich eine Verunreinigung vor.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der ARDRA, Stammbaumanalysen, Sequenzierung, der Untersuchungen zur Populationsdichten, saisonalen Verteilungsanalyse und der Morphologie zusammengefasst. Die Angaben beziehen sich auf die Abbildung 61, Abbildung 34 - Abbildung 36 sowie Tabelle 8 und Tabelle 15; diese werden daher nicht mehr explizit erwähnt.

Kolonien vom Typ 1 sind gelb pigmentiert, glatt, glänzend und beinahe glattrandig. Typ 1 konnte bei den Probennahmen P1, P2 und P3 mit einer Dichte von 5653, 39 bzw. $4.695 \cdot 10^5$ CFU cm⁻² isoliert werden. Die meisten Kolonien wurden bei P3 gefunden, was auf die hohe Dichte auf Blatt 2 zurück zu führen ist. Innerhalb des Stammbaumes befindet sich Typ 1 im Cluster der *γ-Proteobacteriaceae*, dort innerhalb der Gruppe der *Xanthomonadaceae* und scheint nahe verwandt mit Typ 2 und 7 zu sein.

Kolonien von Typ 2 sind gelb pigmentiert, glatt, glänzend und beinahe glattrandig. Typ 2 wurde mit 1131 CFU cm⁻² ausschließlich bei P1 gefunden. Die Sequenz von Typ 2 zeigte 99.47 % Übereinstimmung mit *Xanthomonas gardneri* strain CNPH49 (AY288083), welcher als Verursacher von Läsionen auf Tomaten und Paprika beschrieben ist (Jones et al. 2000). Im Stammbaum befindet sich Typ 2 im Cluster der *Xanthomonadaceae*

Kolonien von Typ 3 sind gelb pigmentiert, glatt, glänzend und glattrandig; der Rand der Kolonie ist hell. Typ 3 wurde mit 1131 CFU cm⁻² ausschließlich bei P1 gefunden. Typ 3 zeigte 99.82 %

Übereinstimmung mit *Pantoea agglomerans* strain GSPB 450 (AF373197). Im Stammbaum befindet sich Typ 3 in der Gruppe der Enterobacteriaceae.

Kolonien der Typen 4 und 6 sind gelb pigmentiert, glatt, glänzend, glatt- und hellrandig. Typ 4 wurde bei P1 – P4 gefunden, mit einer Dichte von 1131, 78, 2.321 * 10⁶ bzw. 390 CFU cm⁻². Typ 6 wurde ausschließlich bei P2 mit 26 CFU cm⁻² detektiert. Typ 4 und 6 zeigten 99.86 bzw. 99.32 % Übereinstimmung mit *Enterobacter agglomerans* strain A84 (AF130948), synonym *Pantoea agglomerans* (NCBI), aus einer Studie über Endophyten in Pflanzen. Im Stammbaum befinden sie sich innerhalb der Enterobacteriaceae.

Kolonien der Typen 5 und 8 sind transparent bis weiß, glatt glänzend, in der Mitte etwas dunkler und glattrandig. Typ 5 wurde ausschließlich bei P2 gefunden mit 30 CFU cm⁻², Typ 8 bei P1 – P4 mit einer Dichte von 390, 317, 1338 und 87 CFU cm⁻². Die vorhandenen Sequenzen stimmten zu 100 % überein, allerdings unterschieden sich die Verdauungsmuster zweifelsfrei, was auf Sequenzunterscheide in nicht sequenzierten Bereichen hindeutet. Typ 5 und 8 zeigten 98.63 bzw. 98.25 % Übereinstimmung mit *Erwinia billingiae* (Y13249). *E. billingiae* gehört zu den unpigmentierten Erwinia-Arten und wurde von kranken Pflanzenteilen (Stamm, Blüten und unreife Früchten) hauptsächlich von Rosaceen isoliert. Es wurde häufig in Verbindung mit Phytopathogenen gefunden, wird aber für eine sekundär invasive Art gehalten (Mergaert et al. 1999). Im Stammbaum befinden sich die Typen 5 und 8 im Cluster der Enterobacteriaceae in der Familie der Erwinia-Arten.

Kolonien von Typ 7 sind morphologisch nicht von Typ 5, 8, 9 und 23 zu unterscheiden. Typ 7 wurde mit einer Dichte von 144 CFU cm⁻² bei P4 detektiert. Typ 7 zeigte 100 % Übereinstimmung mit *Erwinia persicinus* (Z96086), allerdings ist *E. persicinus* rosa pigmentiert, wohingegen der vorliegende Stamm unpigmentiert ist. Die Sequenz zeigte zudem 99 % Übereinstimmung mit *E. billingiae* (Y13249), das zu den unpigmentierten Erwinien zählt (Mergaert et al. 1999). Im Stammbaum befindet sich Typ 7 im Bereich der Enterobacteriaceae.

Kolonien von Typ 9 sind transparent bis weiß, glatt glänzend, in der Mitte etwas dunkler und glattrandig. Typ 9 wurde bei P1 mit einer Dichte von 130 CFU cm⁻² gefunden. Die Sequenz zeigte 99.31 % Übereinstimmung mit *Enterobacter asburiae* (AJ318908), welches aus dem Verdauungstrakt von *Aporrectodea caliginosa* Sav. (Regenwurm) isoliert wurde (Ihssen et al. 2003). Die Position von Typ 9 im Stammbaum innerhalb der Enterobacteriaceae lässt eine nahe Verwandtschaft zu Typ 5 und 8 vermuten.

Kolonien von Typ 10 sind gelb, glänzend, glatt, mit einem breiten, hellen, glatten Rand. Typ 10 wurde bei P3 und P7 mit einer Dichte von 53 bzw. 67 CFU cm⁻² isoliert. Er zeigte 98,73 % Übereinstimmung mit *Pseudomonas syringae* pv. *artropurourea* (AB001440). Im Stammbaum befindet sich Typ 10 im Cluster der Pseudomonaden.

Kolonien von Typ 11 sind dunkelweiß, rund, konvex und am Rand gewellt. Typ 11 wurde bei P2 mit einer Dichte von 0.47 CFU cm^{-2} isoliert. Typ 11 zeigte 99.84 % Übereinstimmung mit *Pseudomonas* sp. K94.23 (AY456705), dieselbe Übereinstimmung zeigt sich auch mit *P. trivialis* (AJ492831) und *P. poae* (AJ492829), die von Gras isoliert wurden (Behrendt et al. 2003). Im Stammbaum ist Typ 11 im Bereich der Pseudomonaden zu finden.

Kolonien von Typ 12 sind weiß, unregelmäßig geformt, matt, erhaben, mit einem ausgefranstem Rand. Typ 12 wurde bei P2 mit einer Dichte von 29 CFU cm^{-2} isoliert. Im Stammbaum lässt sich der Typ den α -Proteobacteria zuordnen, aus der Position lässt sich einer Verwandtschaft zu *Caulobacter* vermuten.

Kolonien von Typ 13 sind dunkelweiß, matt mit einem gewellten Rand. Typ 13 wurde bei P2 mit einer Frequenz von 59 CFU cm^{-2} isoliert. Die Sequenz zeigte 99.70 % Übereinstimmung mit *Bacillus fusiformis* (AY472114). Aufgrund der Position im Stammbaum ist eine Zuordnung zu Gram-positiven Arten zuordnen.

Kolonien von Typ 14 sind weiß, matt, dick mit einem schwach gewellten Rand. Typ 14 wurde bei P1 mit einer Dichte von 130 CFU cm^{-2} detektiert. Er zeigte 99.43 % Übereinstimmung mit 42 Stämmen, von denen die meisten von der Art *Bacillus pumilus* waren. *B. pumilus* (AY112667) wurde u. a. von symptomfreien Karoffelgewebekulturen isoliert (Isenegger et al. 2003). Wie bei Typ 13 ist auch bei Typ 14 im Stammbaum keine Zuordnung möglich.

Kolonien der Typen 15, 16 und 17 sind gelb pigmentiert, glatt, glänzend, mit einem glatten, hellen Rand. Typ 15 wurde bei P3 mit einer Frequenz von $2.320 * 10^6 \text{ CFU cm}^{-2}$, Typ 16 bei P4 mit 42 CFU cm^{-2} und Typ 17 bei P7 mit 139 CFU cm^{-2} gefunden. Die Sequenzübereinstimmungen betrugen 98.38 % bzw. 96.51 % mit *Pseudomonas rhizosphaerae* (AY152673) für Typ 15 und 17, welches von Gras durchwurzeltem Boden isoliert wurde und Phosphat solubilisieren kann (Peix et al 2003). Typ 16 hatte 99.21 % Übereinstimmung mit *Pseudomonas* sp. Fa4 (AY131223), das von Erdbeere isoliert wurde (Krimm 2001). Im Stammbaum bilden diese drei Typen eine Gruppe innerhalb der Pseudomonaden.

Kolonien von Typ 18 sind beige, glänzend, glattrandig und innen heller. Typ 18 wurde bei P4 mit einer Häufigkeit von 176 CFU cm^{-2} isoliert. Im Stammbaum ist Typ 18 zusammen mit Typ 22 im Cluster der Micrococcineae (Gram-Positive mit hohem GC-Gehalt) zu finden. Anhand der Position im Stammbaum lässt sich eine Verwandtschaft zu *Clavibacter michiganensis* vermuten.

Kolonien von Typ 19 sind beige, matt schimmernd und glattrandig. Typ 19 wurde bei P4 mit einer Häufigkeit von 119 CFU cm^{-2} isoliert. Im Stammbaum ist Typ 19 im Cluster der Bacilli (Gram-Positive mit niedrigem GC-Gehalt) zu finden. Auf Grund der Position lässt sich keine genaue Aussage treffen ob Typ 19 zu den Bacillaceae oder den Enterococcaceae zu zählen ist.

Kolonien der Typen 20 und 21 sind rosa, glänzend, glattrandig und innen hell. Bei Typ 20 liegt offensichtlich eine Verunreinigung vor, die auf Abbildung 57, Kolonie 3 nicht zu sehen ist. Typ 20 wurden bei P3 mit einer Häufigkeit von $19.30 \text{ CFU cm}^{-2}$ bzw. Typ 21 bei P7 mit 118 CFU cm^{-2} gefunden. Im Stammbaum lassen sie sich keinem bekannten Cluster zuordnen.

Kolonien von Typ 22 sind gelblich, glänzend mit einem gewellten Rand. Typ 22 wurde bei P3 mit einer Häufigkeit von 231 CFU cm^{-2} isoliert. Im Stammbaum ist Typ 22 zusammen mit Typ 18 im Cluster der Micrococcineae (Gram positiven mit hohem GC-Gehalt) zu finden. Anhand der Position im Stammbaum lässt sich eine Verwandtschaft mit *Clavibacter michiganensis* vermuten.

Kolonien von Typ 23 sind weiß, matt, innen hell, mit einem unregelmäßigen Rand. Typ 23 wurde bei P3 mit einer Häufigkeit von 231 CFU cm^{-2} gefunden. Die Sequenzübereinstimmung betrug 99.56 % mit *Erwinia persicinus* (Z96086) und *E. rhapontici* (AJ233417), im Gegensatz zu Typ 23 sind diese jedoch pink pigmentiert (Mergaert et al. 1999). Im Stammbaum befindet sich Typ 23 im Bereich der Enterobacteriaceae.

Kolonien von Typ 24 sind gelblich-weiß, glänzend mit einem unregelmäßigen Rand. Typ 24 wurde bei P3 (ausschließlich von Blatt 2) mit einer Häufigkeit von $4.640 * 10^6 \text{ CFU cm}^{-2}$ isoliert. Die Sequenz zeigte 100 % Übereinstimmung mit *Acinetobacter johnsonii* (AB099655). Im Stammbaum spiegelt sich diese Übereinstimmung nicht wieder.

Kolonien von Typ 25 sind weiß-gelblich, matt schimmernd, mit einem unregelmäßigen Rand. Typ 25 wurde bei P3 (ausschließlich von Blatt 2) mit einer Häufigkeit von insgesamt $5.837 * 10^7 \text{ CFU cm}^{-2}$ isoliert. Im Stammbaum ist Typ 25 innerhalb der Pseudomonadaceae (γ -Proteobacteria), auf einem Ast mit Typ 26 zu finden.

Kolonien von Typ 26 sind weiß, matt, mit einem unregelmäßigen Rand. Typ 26 wurde bei P3 mit einer Häufigkeit von 438 CFU cm^{-2} gefunden. Typ 26 zeigte 99.52 % Übereinstimmung mit *Pseudomonas syringae* pv. *eriobotryae* (AB001442). Im Stammbaum fügt sich Typ 26, auf einem Ast mit Typ 25, in das Cluster der Pseudomonadaceae ein.

Kolonien von Typ 27 sind dunkelgelb, glänzend mit einem glatten, hellen Rand. Typ 27 wurde bei P7 mit einer Häufigkeit von 70 CFU cm^{-2} gefunden. Typ 27 zeigte 97.31 % Übereinstimmung mit einem unidentifizierten β -Proteobacterium (AY237409), welches aus grasdurchwurzelter Boden isoliert wurde. Im Stammbaum ist Typ 27 im Bereich der β -Proteobacteria positioniert.

Kolonien von Typ 28 sind weiß, matt, mit einem glatten Rand. Typ 28 wurde bei P5 mit einer Häufigkeit von 4528 CFU cm^{-2} gefunden. Typ 28 befindet sich im Stammbaum mit Typ 34 auf einem Ast. Typ 34 wurde an Hand der Sequenz als *Burkholderia* sp. identifiziert. Beide lassen sich im Stammbaum keinem bekannten Cluster zuordnen.

Kolonien von Typ 29 und 32 sind dunkelgelb, glänzend und glattrandig. Typ 29 und 32 wurden bei P5 mit einer Häufigkeit von je 27 CFU cm⁻² gefunden. Typ 29 zeigte 97.89 % Übereinstimmung mit *Afipia* sp. (AY278887) aus der Gruppe der α -Proteobacteria. Typ 32 zeigte 98.29 % Übereinstimmung mit *Caulobacter leidyia* (AJ227812), welches aus dem Verdauungstrakt eines Tausendfüßers isoliert wurde (Sly et al. 1999). Typ 29 und 32 befinden sich im Stammbaum in Bereich der α -Proteobacteria.

Kolonien der Typen 30 und 31 sind rot, matt schimmernd und glattrandig. Die Typen 30 und 31 wurden bei P5 mit einer Häufigkeit von 79 bzw. 80 CFU cm⁻² gefunden. Typ 30 zeigte 96.62 % Übereinstimmung mit *Methylobacterium fujisawaense* (AJ626984) und anderen Methylobacteria. Typ 31 zeigte 99.69 % Übereinstimmung mit *Methylobacterium* sp. (Z23160), welches aus einer Belüftungsanlage isoliert wurde, und mit *M. fujisawaense* (AJ250801) aus der Rhizosphäre von *Medicago sativa*. Im Stammbaum finden sich beide Typen auf einem Ast, der in die Gruppe der α -Proteobacteria fällt.

Kolonien von Typ 33 sind orange, glänzend und glattrandig. Typ 33 wurde bei P7 mit einer Häufigkeit von 211 CFU cm⁻² gefunden. Typ 33 zeigte 99.50 % Übereinstimmung mit *Sphingomonas* sp. (AF395031) und *Sphingomonas aerolata* (AJ429240), einer neuen Art, die aus Luft isoliert wurde (Busse et al. 2003). Im Stammbaum befindet sich Typ 33 in der Gruppe der α -Proteobacteria, in direkter Nähe zu *Sph. aurantiaca*, einem direkten Verwandten von *Sph. aerolata*.

Kolonien von Typ 34 sind weiß, stark glänzend und glattrandig. Typ 34 wurde bei P7 mit einer Häufigkeit von 209 CFU cm⁻² gefunden. Typ 34 zeigte 98.41 % Übereinstimmung mit *Burkholderia* sp. (AY178076) bzw. *B. sordidicola* (AF512826), letztere eine neue Art, die in Assoziation mit dem Faulpilz *Phanerochaete sordida* gefunden wurde (Lim et al. 2003). Im Stammbaum lässt sich Typ 34, welcher sich auf einem Ast mit Typ 28 befindet, keinem Cluster zuordnen.

Kolonien von Typ 35 sind rosa, glänzend und glattrandig. Typ 35 wurde bei P5 mit einer Häufigkeit von 53 CFU cm⁻² gefunden. Im Stammbaum findet sich Typ 35 auf einem Ast mit Typ 20 und 21, der sich keinem Cluster zuordnen lässt.

Kolonien von Typ 36 sind weiß und klein. Typ 36 wurde bei P5 mit einer Häufigkeit von 3626 CFU cm⁻² gefunden. Typ 36 zeigte 96.89 % Übereinstimmung mit einem α -Proteobacterium, das aus Trinkwasser isoliert wurde (AY328840, Williams et al. 2004). Im Stammbaum findet sich Typ 36 im Cluster der α -Proteobacteria.

7.1.4 Populationsdichten

Tabelle 16 Populationsdichten

Die Populationsdichten der einzelnen Typen bei jeder Probennahme [CFU cm⁻²]; Phylogenetische Zuordnung wie in der Diskussion.

Typ	P1	P2	P3	P3 *	P4	P5	P7	Gattung/ Familie/ Abteilung
1	5653	39	1168	46949				γ-Proteobacterium
2	1131							<i>Xanthomonas</i>
3	1131							<i>Pantoea</i>
4	1131	78	603	232526	390			<i>Pantoea</i>
5		30						<i>Erwinia</i>
6		26						<i>Pantoea</i>
7					144			<i>Erwinia</i>
8	390	317	2311	1338	87			<i>Erwinia</i>
9	130							<i>Enterobacter</i>
10			92	53			67	<i>Pseudomonas</i>
11		0.47						<i>Pseudomonas</i>
12		29						<i>Caulobacter</i>
13		59						<i>Bacillus</i>
14	130							<i>Bacillus</i>
15				232018				<i>Pseudomonas</i>
16					42			<i>Pseudomonas</i>
17							139	<i>Pseudomonas</i>
18					176			Microbacteriaceae
19					119			Bacilli
20			33	19				-
21							118	-
22			398	231				Microbacteriaceae
23			398	231				<i>Erwinia</i>
24				464035				<i>Acinetobacter</i>
25				5836692				<i>Pseudomonas</i>
26			757	438				<i>Pseudomonas</i>
27							70	β-Proteobacterium
28						4528		<i>Burkholderia</i>
29						27		<i>Sphingomonas</i>
30						79		<i>Methylobacterium</i>
31						80		<i>Methylobacterium</i>
32						27		<i>Caulobacter</i>
33							211	<i>Sphingomonas</i>
34							209	<i>Burkholderia</i>
35						53		-
36						3626		α-Proteobacterium

* P3 mit Blatt 2.

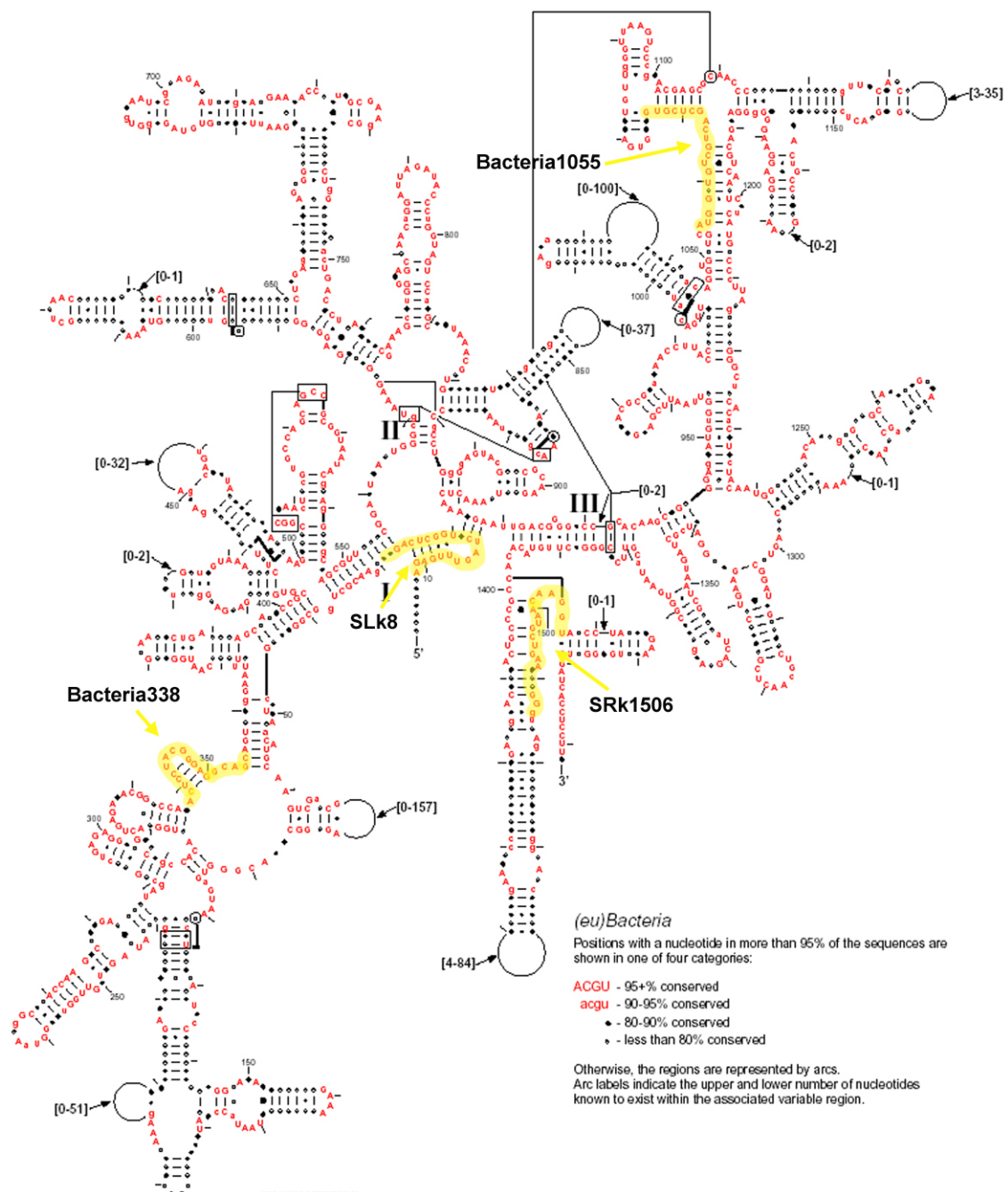


Abbildung 62 Sekundärstruktur der 16S rDNA

Konsensus-Sequenz der 16S rDNA von 5688 Eubakterien (Comparative RNA Web Site, URL: <http://www.rna.icmb.utexas.edu/>). Die Positionen der Primer, die bei PCR (SLk8, Srk1508) und Sequenzierung (Bacteria338, Bacteria1055) verwendet wurden, sind markiert.

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Lukas Schreiber danke ich dafür, dass er mir ermöglicht hat dieses interessante Themengebiet zu erforschen. Seine konstruktive Diskussionsbereitschaft, stete Ansprechbarkeit und das Vertrauen auf meine Fähigkeiten haben einen Rahmen geschaffen, in dem mir ein selbständiges und eigenverantwortliches Arbeiten möglich war.

Meinen Kollegen Dr. Klaus Hartmann, Dr. Rochus "Benni" Franke, Dr. Katja Vorndran, Marlene Kühne, Steffi Ludwig, Salem Elshatshat, Tobias Wojechowski und Eva Simanova danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre, die einen nicht unerheblichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet hat. Besonders Klaus Hartmann möchte ich für die gute Teamarbeit beim Laborumzug und die inspirierenden, fachlichen Diskussionen danken.

Bei allen Praktikanten, die ich während dieser Zeit betreut habe, möchte ich mich bedanken; vor allem bei Susanne Dieringer, Isabel Briesen und Anja Bodenheim, die mir eine große Hilfe bei der Datenerhebung waren.

Beim Nees Institut der Universität Bonn möchte ich mich für die Nutzung des Elektronenmikroskops bedanken, insbesondere bei Dr. Kerstin Koch und Hans-Jürgen Ensikat für die gute Einführung und geduldige Beantwortung meiner vielen fachlichen Fragen.

Prof. Dr. Wilfried Schwab, Biomolekulare Lebensmitteltechnologie, TU München, Dr. Johan Leveau, Centre for Terrestrial Ecology am Netherlands Insitutue of Ecology, Heteren, Niederlande und Dr. Achim Gau, Institut für Botanik, Universität Hannover danke ich für die Kooperation.

All meinen Freunden danke ich für das (bisschen) Leben neben der Forschung.

Ganz besonders möchte ich aber meiner Familie danken, die mich in meinem Vorhaben begleitet und in jeder Hinsicht unterstützt hat, obwohl sie mich so selten sehen durfte.

ERKLÄRUNG

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit in allen Teilen selbständig angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Diese Dissertation wurde in gleicher oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Ich habe bisher noch keine anderen akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Bonn,

PUBLIKATIONEN

Krimm U, Abanda-Nkpwatt D, Schwab W, Schreiber L. Epiphyllic microorganisms on strawberry plants (*Fragaria ananassa* cv. Elsanta): identification of bacterial isolates and analysis of their interaction with leaf surfaces. Eingereicht bei FEMS Microbiology Ecology.

Schreiber L, **Krimm U**, Knoll D, Sayed M, Auling G, Kroppenstedt RM (2005) Plant-microbe interactions: identification of epiphyllic bacteria and their effects on barrier properties of plant cuticles. New Phytologist, im Druck

Abanda-Nkpwatt D, **Krimm U**, Coiner H, Schreiber L, Schwab W (2005) Plant volatiles modulate the antagonistic effect of epiphytic bacteria against the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* *in vitro*. Environmental and Experimental Botany, im Druck

Abanda-Nkpwatt D, **Krimm U**, Schreiber L, Schwab W. Dual antagonism of aldehydes and epiphytic bacteria from strawberry leaf surfaces against the pathogenic fungus *Botrytis cinera* *in vitro*. Eingereicht bei Biocontrol.

Schreiber L, **Krimm U**, Knoll D (2004) Interactions between epiphyllic microorganisms and leaf cuticles, Kapitel in *Plant surface microbiology*, Springer Verlag.